

PCT/JP 2004/005585

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

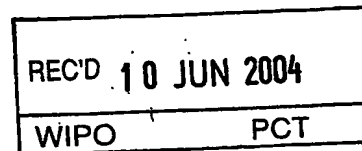
19.4.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   4 月 2 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 1 1 6 2 8 0  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [J P 2 0 0 3 - 1 1 6 2 8 0]



出 願 人      独立行政法人産業技術総合研究所  
Applicant(s):

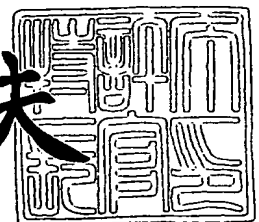
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   5 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 0 4 5 1 1 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 341H03001

【提出日】 平成15年 4月21日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 R h o d o c o c c u s 属細菌における組換えタンパク  
質を生産する方法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 1 7 丁目 2 - 1 独立行  
政法人産業技術総合研究所 北海道センター内

【氏名】 中島 信孝

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 1 7 丁目 2 - 1 独立行  
政法人産業技術総合研究所 北海道センター内

【氏名】 田村 具博

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100111741

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 夏夫

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 Rhodococcus属細菌における組換えタンパク質を生産する方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 TipA遺伝子プロモーターの-10領域配列に変異を導入したプロモーターであって、チオストレプトン非依存的に構成的に下流に存在する遺伝子を発現し得る変異TipA遺伝子プロモーターの有する塩基配列からなるDNA。

【請求項 2】 -10領域配列の変異が、CAGCGT配列のTATAAT配列への変異である請求項 1 記載のDNA。

【請求項 3】 配列番号 107 で表される塩基配列を有する、請求項 2 記載のDNA。

【請求項 4】 外来遺伝子を構成的に発現するためのプロモーター配列が請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のDNAの有する塩基配列であって、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む、Rhodococcus属細菌用構成型発現ベクター。

【請求項 5】 配列番号 101 に表される塩基配列を有するpNit-RT1、配列番号 102 に表される塩基配列を有するpNit-RT2、配列番号 105 に表される塩基配列を有するpNit-RC1、配列番号 106 に表される塩基配列を有するpNit-RC2、配列番号 99 に表される塩基配列を有するpNit-QT1、配列番号 100 に表される塩基配列を有するpNit-QT2、配列番号 103 に表される塩基配列を有するpNit-QC1、配列番号 104 に表される塩基配列を有するpNit-QC2、からなる群から選択される請求項 4 記載のRhodococcus属細菌用構成型発現ベクター。

【請求項 6】 Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、請求項 4 または 5 に記載の発現ベクター。

【請求項 7】 さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必要なDNA領域を含み、大腸菌中で複製可能な請求項 4 から 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 8】 請求項 4 から 7 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

【請求項 9】 請求項 4 から 7 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用い



て4℃から35℃の温度で組換えタンパク質を生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を発現し得る発現ベクターに関する。

【0002】

また、本発明は、宿主細胞中で組換えタンパク質を発現することができる誘導型発現ベクターおよび構成型発現ベクター、および該ベクターを用いて組換えタンパク質を発現させる方法に関する。さらに、本発明はRhodococcus属細胞内で異なるベクター上にコードされる複数の遺伝子を同時に共発現する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】

現在、真核生物由来のタンパク質を組換え体として大量調製するためには大腸菌を宿主とした発現システムが広く用いられている。これは該システムが扱いが容易でかつ最も研究が進んでいるからである (Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7: 494-499 [1996])。

【0004】

一方、本発明者は以前にRhodococcus erythropolisも組換えタンパク質生産の宿主として用いることができることを示した (特願2002-235008)。R. erythropolisは4℃から35℃まで増殖可能な放線菌の一種で、この菌を宿主とした発現システムの最大の特徴は4℃など10℃以下での組換えタンパク質生産が可能な点である。他の大腸菌やバチルス属細菌、酵母菌、Sf9昆虫細胞 (Cereghino and Cregg, Curr. Opin. Biotechnol. 10 422-427 [1999]、Miller, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 97-101 [1993]) を用いたシステムでは、10℃以下での組換えタンパク質生産は極めて困難である。10℃以下で組換えタンパク質を生産させることで、それまでは生産困難だったタンパク質、例えば宿主細胞の増殖を阻害するものや30℃前後では不溶化するもの、低温に適応した生物由来のタンパク質

、などを生産することが可能になった。

#### 【0005】

本発明者等は、pTipベクターと呼ばれる一群のRhodococcus属細菌用発現ベクターを構築し、組換えタンパク質生産に用いていた（特願2002-235008）。これらベクターは、抗生物質チオストレプトンでその発現が誘導されるTipA遺伝子のプロモーターを含み、その下流に外来遺伝子（発現させるべき遺伝子）をクローニングするためのマルチクローニング部位（MCS）を含む。従ってpTipベクターは、チオストレプトン誘導型発現ベクターであり、これら発現ベクターで形質転換されたRhodococcus属細菌においては、チオストレプトンが培養液中に添加されたときにのみ、外来タンパク質の生産が誘導される。

#### 【0006】

##### 【非特許文献1】

Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7: 494-499 [1996]

##### 【非特許文献2】

Cereghino and Cregg, Curr. Opin. Biotechnol. 10 422-427 [1999]

##### 【非特許文献3】

Miller, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 97-101 [1993]

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上記のように本発明者らは、pTipベクターと呼ばれる一群のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを構築し、組換えタンパク質生産に用いていたが、未だ2点開発すべき点が残されていた。

#### 【0008】

第1に、前記pTipベクターはすべて、Rhodococcus属細菌内で自律複製するために必要なDNA領域（複製起点等）が一つの内在性プラスミドに由来していたために、別々の外来遺伝子を含む複数の発現ベクターを同時に、安定に、Rhodococcus属細菌内に共存させることは困難であった。これは同一の自律複製起点を持つ異種プラスミドが細菌内で共存できない、プラスミド不和合性（plasmid incompatibility）と呼ばれる現象によるもので、多くの細菌でこの現象が報告され

ている (Novick, Microbiol. Rev. 51 381-395 [1987])。異種プラスミドを単一の細菌の菌体内で共存させることが出来れば、複数の組換えタンパク質を同時に生産することが出来る。例えば、20Sプロテアソームと呼ばれるタンパク質複合体は $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの2つのポリペプチドから構成されており、機能的な20Sプロテアソーム複合体を組換え体として生産する場合には、これら2つのポリペプチドを共発現させなければならない。2つのポリペプチドを単一細胞内で共発現させる際には、1つの発現ベクターに複数の外来遺伝子を導入することによって、達成することも出来るが、ベクターのサイズが大きくなったり、制限酵素部位の都合上クローニング過程が複雑になったり、不便であることが多い。現在までRhodococcus属細菌において、複数の発現ベクターを用いた組換えタンパク質の共発現系はW002/055709に記載されたものが存在した。

#### 【0009】

第2に、Rhodococcus属細菌の研究のためには、誘導型発現ベクターのみならず、構成型発現ベクターも重要なツールであるが、構成型発現ベクターが未開発であったことである。なお、既知のRhodococcus属細菌における構成型発現ベクターとしては、変異型ニトリルヒドラターゼ遺伝子プロモーターを用いたものや(特開平9-28382、特開平10-248578)、rrnプロモーターを用いたものが知られている (Matsui et al., Curr. Microbiol. 45 240-244 [2002])。

#### 【0010】

Rhodococcus属細菌の中には、PCB (polychlorinated biphenyl) や農薬等、様々な難分解性化合物を分解する菌株が多数知られており (バイオレメディエーション) (Bell et al., J. Appl. Microbiol. 85 195-210 [1998])、また、ある菌株はアクリルアミド等有用な化合物を菌体内に蓄積させる事も知られていて、すでに工業生産に利用されている (バイオプロセス、バイオリクター) (Yamada et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60 1391-1400 [1996])。従って、上述した2点の改良点が克服されれば、組換えタンパク質生産時のみならず、バイオレメディエーション、バイオプロセスの研究時においてもRhodococcus属細菌用発現ベクターの利用性が増すと考えられる。

#### 【0011】

## 【課題を解決するための手段】

まず、プラスミド不和合性の問題を解決するためには、本発明者らが先に構築したpTipベクターに用いていたRhodococcus属細菌内で自律複製するために必要なDNA領域とは配列が違う同等の配列を新たに分離し、利用する必要がある。前記pTipベクターでは全てR. erythropolis JCM2895株から分離した内在性プラスミドpRE2895 (5.4キロベースペア；以下kbと略)のうち、自律複製に必要最小限なRepAB遺伝子を含む領域 (1.9 kb) を用いていた。従って、他のR. erythropolis株からDNA配列の異なる内在性プラスミドを分離し、新規発現ベクターを構築することとした。また、Rhodococcus属細菌の形質転換体選択マーカーとして、前記pTipベクターにおいてはテトラサイクリン耐性遺伝子のみ開発していたが、複数のプラスミドで形質転換するためには、別の抗生物質に対する耐性遺伝子を新規に開発する必要がある。本発明者は、R. erythropolis DSM 313株がクロラムフェニコールに対して耐性であることを見出し、耐性を付与している遺伝子を分離し、利用することとした。

## 【0012】

さらに、構成型発現ベクター開発のため、TipA遺伝子プロモーターに変異を導入し、構成的に、即ち、チオストレプトン非依存的に、外来遺伝子を発現せしめる変異体を作製することとした。

## 【0013】

このようにして、pRE2895が有する自律複製に必要な領域および誘導型のTipA遺伝子プロモーターを有する前記pTipベクターの他に、新たに異なる自律複製するために必要なDNA領域を有するベクターであって、TipA遺伝子プロモーターを有しており誘導発現が可能なベクター、前記pTipベクターとは異なる自律複製するために必要なDNA領域を有するベクターであって、TipA遺伝子プロモーターに変異を導入したプロモーターを有しており構成的に発現が可能なベクター、および前記pTipベクターと同じ自律複製するために必要なDNA領域およびTipA遺伝子プロモーターに変異を導入したプロモーターを有しており構成的に発現が可能なベクターを構築した。これらのベクターのうち自律複製するために必要なDNA領域が異なる2種類のベクターであって、それぞれ異なる外来タンパク質をコード

する遺伝子を含むベクターで一つの宿主を共形質転換することが可能であり、該共形質転換した宿主で該異なる外来タンパク質を同時に共発現させることが可能である。

【0014】

すなわち、本発明は以下の通りである。

- [1] TipA遺伝子プロモーターの-10領域配列に変異を導入したプロモーターであって、チオストレプトン非依存的に構成的に下流に存在する遺伝子を発現し得る変異TipA遺伝子プロモーターの有する塩基配列からなるDNA、
- [2] -10領域配列の変異が、CAGCGT配列のTATAAT配列への変異である[1]のDNA、
- [3] 配列番号107で表される塩基配列を有する、[2]のDNA、
- [4] 外来遺伝子を構成的に発現するためのプロモーター配列が[1]から[3]のいずれかのDNAの有する塩基配列であって、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む、Rhodococcus属細菌用構成型発現ベクター、
- [5] 配列番号101に表される塩基配列を有するpNit-RT1、配列番号102に表される塩基配列を有するpNit-RT2、配列番号105に表される塩基配列を有するpNit-RC1、配列番号106に表される塩基配列を有するpNit-RC2、配列番号99に表される塩基配列を有するpNit-QT1、配列番号100に表される塩基配列を有するpNit-QT2、配列番号103に表される塩基配列を有するpNit-QC1、配列番号104に表される塩基配列を有するpNit-QC2、からなる群から選択される[4]のRhodococcus属細菌用構成型発現ベクター、
- [6] Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、[4]または[5]の発現ベクター、
- [7] さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必要なDNA領域を含み、大腸菌中で複製可能な[4]から[6]のいずれかの発現ベクター、
- [8] [4]から[7]のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体、および
- [9] [4]から[7]のいずれかの発現ベクターを用いて4℃から35℃の温度で組換えタンパク質を生産する方法。

さらに、本発明は以下の通りである。

- [10] Rhodococcus属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式で複製し得る環状プラスミド、
- [11] Rhodococcus属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式に必須なRep遺伝子、2本鎖複製起点領域DSO (double-stranded origin) および1本鎖複製起点領域SSO (single-stranded origin) を有する[10]の環状プラスミド、
- [12] ローリングサークル型の複製様式に必須なDNAの塩基配列が配列番号90に表される塩基配列の第3845位から第5849位の塩基配列である、[11]の環状プラスミド、
- [13] 配列番号90に表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号90に表される塩基配列を有するDNAに相補的な配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有する[10]から[12]のいずれかのプラスミド、
- [14] [10]から[12]のいずれかの環状プラスミドを含む形質転換体、
- [15] ローリングサークル型の複製様式で複製し得るベクターであって、Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を4℃から35℃の温度条件下で発現しうる発現ベクター、
- [16] Rhodococcus属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式に必須なRep遺伝子、2本鎖複製起点領域DSO (double-stranded origin) および1本鎖複製起点領域SSO (single-stranded origin) を有する[15]の発現ベクター、
- [17] ローリングサークル型の複製様式に必須なDNAの塩基配列が配列番号90に表される塩基配列の第3845位から第5849位の塩基配列である、[16]の発現ベクター、
- [18] 外来遺伝子を発現誘導するための誘導型プロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む[15]から[17]のいずれかの発現ベクター、
- [19] 発現誘導のための誘導型プロモーターがTipA遺伝子プロモーターで、誘

導物質がチオストレプトンである、[18]の発現ベクター、

[20] プロモーターの塩基配列が[1]から[3]のいずれかのDNAの有する塩基配列からなる[4]の発現ベクター、

[21] 配列番号93に表される塩基配列を有するpTip-RT1、配列番号94に表される塩基配列を有するpTip-RT2、配列番号97に表される塩基配列を有するpTip-RC1、配列番号98に表される塩基配列を有するpTip-RC2からなる群から選択される[15]から[19]のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター、

[22] Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を構成的に発現し得る発現ベクターであって、プラスミドpRE2585由来のRhodococcus属細菌中でのプラスミドの自律複製に必要なDNA配列および[1]から[3]のいずれかのプロモーター配列DNAを含む、Rhodococcus属細菌中で4℃から35℃の温度条件下で外来遺伝子を構成的に発現し得る発現ベクター、

[23] プラスミドpRE2585由来のRhodococcus属細菌中でのプラスミドの自律複製に必要なDNA配列がRepAおよびRepB遺伝子を含む1.9kbの領域のDNA配列である[22]の発現ベクター、

[24] 構成型プロモーター配列の下流に、さらにリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む[22]または[23]の発現ベクター、

[25] 配列番号99に表される塩基配列を有するpNit-QT1、配列番号100に表される塩基配列を有するpNit-QT2、配列番号103に表される塩基配列を有するpNit-QC1、配列番号104に表される塩基配列を有するpNit-QC2、からなる群から選択される[22]から[24]のいずれかのRhodococcus属細菌用構成型発現ベクター、

[26] 互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも2種類のRhodococcus属細菌由来のプラスミドを含むRhodococcus属細菌であって、少なくとも2種類のプラスミドが、プラスミドの自律複製に必要なDNA配列として、それぞれローリングサークル型複製様式をもつDNA配列と、pRE2585由来のプラスミドの自律複製に必要なDNA配列を有する、Rhodococcus属細菌、

[27] 互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも2種類のRhodococcus属細菌由来の発現プラスミドベクターであり外来タンパク質をコードする遺伝子を含む発現プラスミドベクターを含むRhodococcus属細菌であって、少なくとも2種類のプラスミドベクターが、プラスミドの自律複製に必要なDNA配列として、それぞれRhodococcus属細菌由来のローリングサークル型複製様式をもつDNA配列と、pRE2585由来のプラスミドの自律複製に必要なDNA配列を有し、外来タンパク質をコードする遺伝子を4℃から35℃の温度条件下で共発現し得るRhodococcus属細菌、

[28] 2種類のプラスミドベクターが外来タンパク質を生産せしめるためのプロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列、をそれぞれ全て含む、[27]のRhodococcus属細菌、

[29] 少なくとも2種類のプラスミドベクターの一方が、[4]、[5]、[15]～[19]、[20]および[21]のいずれかのベクターであり、もう一方が、[22]から[25]のいずれかのベクターもしくは[22]から[25]のベクターにおいて少なくともプロモーターを誘導型プロモーターであるTipA遺伝子プロモーターに置換した誘導発現し得るベクターである、[27]または[28]のRhodococcus属細菌、

[30] 少なくとも2種類のプラスミドベクターの一方が、[4]、[5]、[15]～[19]、[20]および[21]のいずれかのベクターであり、もう一方が、配列番号49に表される塩基配列を有するpTip-NH1、配列番号50に表される塩基配列を有するpTip-NH2、配列番号51に表される塩基配列を有するpTip-CH1、配列番号52に表される塩基配列を有するpTip-CH2、配列番号53に表される塩基配列を有するpTip-LNH1、配列番号54に表される塩基配列を有するpTip-LNH2、配列番号55に表される塩基配列を有するpTip-LCH1、配列番号56に表される塩基配列を有するpTip-LCH2、配列番号91に表される塩基配列を有するpTip-QT1、配列番号92に表される塩基配列を有するpTip-QT2、配列番号95に表される塩基配列を有するpTip-QC1、配列番号96に表される塩基配列を有するpTip-QC2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1、[22]から[25]のい



いずれかのベクターまたは[22]から[25]のいずれかのベクターにおいて少なくともプロモーターを誘導型プロモーターであるTipA遺伝子プロモーターに置換した誘導発現し得るベクターからなる群から選択されるベクターである、[27]から[29]のいずれかのRhodococcus属細菌、

[31] ローリングサークル型の複製様式に必須なDNA配列が配列番号90に表される塩基配列の第3845位から第5849位のDNAであり、pRE2585由来のプラスミドの自律複製に必要なDNA配列がRepAおよびRepB遺伝子を含む1.9 kbの領域のDNAである[26]から[30]のいずれかのRhodococcus属細菌、

[32] 互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも2種類のRhodococcus属細菌由来の発現プラスミドベクターであり外来タンパク質をコードする遺伝子を含む発現プラスミドベクターを含むRhodococcus属細菌であって、少なくとも2種類のプラスミドベクターが、プラスミドの自律複製に必要なDNA配列として、それぞれRhodococcus属細菌由来のローリングサークル型複製様式をもつDNA配列と、pRE2585由来のプラスミドの自律複製に必要なDNA配列を有する少なくとも2種類のベクターでRhodococcus属細菌を形質転換し、培養しそれぞれの発現ベクターが含む外来タンパク質をコードする遺伝子を4℃から35℃の温度条件下で共発現させて該外来タンパク質を産生させる方法、

[33] 2種類のプラスミドベクターが外来タンパク質を生産せしめるためのプロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列、をそれぞれ全て含む、[32]の方法、

[34] 少なくとも2種類のプラスミドベクターの一方が、[4]、[5]、[15]～[19]、[20]および[21]のいずれかのベクターであり、もう一方が、配列番号49に表される塩基配列を有するpTip-NH1、配列番号50に表される塩基配列を有するpTip-NH2、配列番号51に表される塩基配列を有するpTip-CH1、配列番号52に表される塩基配列を有するpTip-CH2、配列番号53に表される塩基配列を有するpTip-LNH1、配列番号54に表される塩基配列を有するpTip-LNH2、配列番号55に表される塩基配列を有するpTip-LCH1、配列番号56に表される塩基配列を有するpTip-LCH2、配列番号91に表される塩基配列を有するpTip-QT1

、配列番号 92 に表される塩基配列を有する pTip-QT2、配列番号 95 に表される塩基配列を有する pTip-QC1、配列番号 96 に表される塩基配列を有する pTip-QC2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1、[22] から [25] のいずれかのベクターまたは [22] から [25] のいずれかのベクターにおいて少なくともプロモーターを誘導型プロモーターである TipA 遺伝子プロモーターに置換した誘導発現し得るベクターからなる群から選択されるベクターである、[32] から [34] のいずれかの方法、

[35] ローリングサークル型の複製様式に必須な DNA の塩基配列が配列番号 90 に表される塩基配列の第 3845 位から第 5849 位の塩基配列であり、pRE2585 由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列が RepA および RepB 遺伝子を含む 1.9 kb の領域の DNA である [32] から [34] のいずれかの方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0015】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、Rhodococcus 属細菌から単離された、ローリングサークル型の複製様式で複製し得る環状プラスミドおよび該環状プラスミドから構築された発現ベクターを包含する。ローリングサークル型の複製様式とは、二本鎖環状 DNA の複製の様式であり、特異的エンドヌクレアーゼの作用により特定の DNA 鎖上の特定の位置にニックが入り、そのニックの 3'-OH 端から DNA 合成が開始され、ニックの入っていない環状 DNA 鎖を鋳型として一回りする形で進む複製様式をいう。このような複製様式をとるためには、ローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域が必要であり、例えば Rep 遺伝子が挙げられる。さらに、2 本鎖複製起点領域 DS0 (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) が必要である。従って、本発明のローリングサークル型の複製様式で複製し得る環状プラスミドおよび該環状プラスミドから構築された発現ベクターは、ローリングサークル型の複製様式に必要な DNA 領域、すなわち Rep 遺伝子、2 本鎖複製起点領域 DS0 (double-stranded origin) および 1 本鎖複製起点領域 SS0 (single-stranded origin) を含むプラスミドおよび発現ベクターである。このようなプラスミドは、Rhodococcus 属細菌から単離することができ例えば、Rho

dococcus erythropolis DSM8424株から単離したpRE8424が挙げられ、その全長配列を配列番号90に示す。配列番号90中、第3845位から5849位までがローリングサークル型の複製様式に必要なDNA領域、すなわちRep遺伝子のDNA、2本鎖複製起点領域DSO (double-stranded origin) および1本鎖複製起点領域SSO (single-stranded origin) を表す。

#### 【0016】

本発明は、配列番号90で表されるプラスミドを構成するDNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAから構成されるプラスミドであって、ローリングサークル型の複製様式で複製し得るプラスミドも包含する。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が500~1000 mM、好ましくは700 mMであり、温度が50~70 °C、好ましくは65 °Cでの条件をいう。このようなプラスミドはその全長塩基配列が配列番号90で表される塩基配列とBLAST等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列からなるプラスミドである。

#### 【0017】

該プラスミドから得られたローリングサークル型の複製様式に必要なDNA領域であるRep遺伝子、2本鎖複製起点領域DSO (double-stranded origin) および1本鎖複製起点領域SSO (single-stranded origin) を含み、さらにプロモーター配列、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む発現ベクターも本発明に包含される。さらに、外来遺伝子および転写終結配列を含んでいてもよく、プロモーター活性を有するDNA配列、外来遺伝子および転写終結配列は発現カセット (Expression cassette) を構成する。ここで、プロモーター配列は薬剤等の誘導因子によりその下流に導入した外来遺伝子を誘導的に発現し得るプロモーターも、誘導因子に依存することなく構成的に外来遺伝子を発現し得るプロモーターも含まれる。前者の誘導的に外来遺伝子を発現し得るプロモーターとして、例えばTipA遺伝子プロモーターが挙げられ、チオストレプトンの存在下でその下流の外来遺伝子を誘導的に発現する。さらに、本発明のベクターは、TipAタンパク質をコードするTi

pA遺伝子、TipA遺伝子の発現を誘導するThcA遺伝子プロモーター等の適当なプロモーターを含んでいてもよい。TipA遺伝子およびTipA遺伝子発現用プロモーターは誘導カセット (Inducer cassette) を構成する。宿主細胞がRhodococcus属に属する細菌である場合、該細菌はチオストレプトンに対して感受性であるため、チオストレプトンに対しての耐性を付与するチオストレプトン耐性遺伝子等を組込む。さらに、TipA遺伝子プロモーターはTipA-LG10プロモーター等のその配列を改変させたものでもよい。TipA遺伝子プロモーターの配列は図12に示される。

#### 【0018】

また、後者の構成的に外来遺伝子を発現し得るプロモーターとして、前記TipA遺伝子プロモーターを改変したプロモーターが挙げられる。このような改変TipA遺伝子プロモーターとしては、TipA遺伝子プロモーターの-10領域配列に変異を導入したプロモーターが挙げられ、具体的には、-10領域配列の変異が、CAGCGT配列のTATAAT配列への変異であるプロモーターが挙げられる。さらに、このようなプロモーターの一例として、図19に示す配列に含まれるプロモーターが例示できる。

#### 【0019】

また、図12に示すプロモーターの配列を有するDNAまたは図19に示す配列に含まれるプロモーターの配列を有するDNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAからなり、それぞれのプロモーター活性と同等の活性を有するポリヌクレオチドもプロモーターとして用いることができる。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が500~1000 mM、好ましくは700 mMであり、温度が50~70 °C、好ましくは65 °Cでの条件をいう。このようポリヌクレオチドはその全長塩基配列が上記プロモーターの塩基配列とBLAST等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列からなるプロモーターである。

#### 【0020】

本発明は、さらに前記ベクターにさらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必要

なDNA領域ならびに大腸菌の形質転換体選択マーカを含むベクターも含まれ、このようなベクターはRhodococcus属細菌と大腸菌とのシャトルベクターとして利用できる。この際、大腸菌では構成型発現ベクターとして利用することができる。大腸菌用プラスミドの自律複製に必要なDNA領域としてはColE1、ColE2配列等、大腸菌の形質転換体選択マーカとしてはアンピシリン耐性遺伝子などの公知のものを使用することができ、これらは公知の大腸菌用クローニングベクターから得ることができる。

### 【0021】

TipA遺伝子プロモーター、ローリングサークル型の複製様式に必要なDNA領域、2本鎖複製起点領域DSO (double-stranded origin) および1本鎖複製起点領域SSO (single-stranded origin) を含み、さらに前記プロモーター配列の下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列および大腸菌用プラスミドの自律複製に必要なDNA領域を含むRhodococcus用発現ベクターとして、配列番号93に表される塩基配列を有するpTip-RT1、配列番号94に表される塩基配列を有するpTip-RT2、配列番号97に表される塩基配列を有するpTip-RC1、配列番号98に表される塩基配列を有するpTip-RC2が例示できる。また、TipA遺伝子プロモーターの代わりにTipA遺伝子プロモーターの-10領域配列の変異がCAGCGT配列のTATAAT配列への変異であるプロモーターを有するベクターとしては、配列番号101に表される塩基配列を有するpNit-RT1、配列番号102に表される塩基配列を有するpNit-RT2、配列番号105に表される塩基配列を有するpNit-RC1、配列番号106に表される塩基配列を有するpNit-RC2が例示できる。これらの、配列番号で表される塩基配列からなる構成するDNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAから構成されるベクターであって、外来遺伝子を宿主微生物中で発現し得るベクターも本発明に包含される。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が500~1000 mM、好ましくは700 mMであり、温度が50~70℃、好ましくは65℃での条件をいう。このようなベクターはその全長塩基配列が上記ベクターの配列番号で表される塩基配列とBLAST等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、90%以上、

好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列からなるベクターである。配列番号で示される以下のベクターについても同様である。

#### 【0022】

本発明は、さらに上記のローリングサークル型の複製様式に必要なDNA領域 (Rep遺伝子、DSOおよびSSO) ではなく、他の自律複製に必要なDNA領域を含む発現ベクターをも包含する。このように複製に必要なDNA領域が異なる発現ベクター同士は、一つの宿主に同時に導入し、安定に保持することができる。他の自律複製に必要なDNA領域として例えば、RepA遺伝子およびRepB遺伝子が挙げられる。RepA遺伝子およびRepB遺伝子を含むDNA領域は、Rhodococcus属細菌、例えばR. erythropolis JCM2895株から分離した内在性プラスミドpRE2895から単離することができる。RepA遺伝子およびRepB遺伝子を含む1.9 kbの領域は、配列番号49の第6233位から第8166位であり、このうちRepA ORFは6765位から7652位、RepB ORFは7652から7936位である。また、RepA遺伝子およびRepB遺伝子を含むDNA領域は後述の参考例に記載のベクターpHN129の制限地図 (図1) を参照すれば得ることができる。また、配列番号49の第6233位から第8166位で表される塩基配列からなるDNAに相補的なDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、ベクターに自律複製能を付与するDNAも本発明のRepA遺伝子およびRepB遺伝子を含む1.9 kbの領域として用いることができる。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が500~1000 mM、好ましくは700 mMであり、温度が50~70 °C、好ましくは65 °Cでの条件をいう。このようなDNAはその全長塩基配列が配列番号49の第6233位から第8166位で表される塩基配列とBLAST等 (例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて) を用いて計算したときに、90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAである。この自律複製に必要なDNA領域およびTipA遺伝子プロモーターの-10領域配列がCAGCGT配列のTATAAT配列へ変異したプロモーター、さらにその下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位配列を含む発現ベクターを含む発現ベクターはマルチクロニング部位に組込まれた外来遺伝子を誘導因子に依存す

ることなく構成的に発現することができる。このような発現ベクターとして、配列番号 99 に表される塩基配列を有する pNit-QT1、配列番号 100 に表される塩基配列を有する pNit-QT2、配列番号 103 に表される塩基配列を有する pNit-QC1、配列番号 104 に表される塩基配列を有する pNit-QC2、からなる群から選択される Rhodococcus 属細菌用構成型発現ベクターが挙げられ、さらにチオストレプトンの存在下で、導入された外来遺伝子を誘導的に発現し得る配列番号 49 に表される塩基配列を有する pTip-NH1、配列番号 50 に表される塩基配列を有する pTip-NH2、配列番号 51 に表される塩基配列を有する pTip-CH1、配列番号 52 に表される塩基配列を有する pTip-CH2、配列番号 53 に表される塩基配列を有する pTip-LNH1、配列番号 54 に表される塩基配列を有する pTip-LNH2、配列番号 55 に表される塩基配列を有する pTip-LCH1、配列番号 56 に表される塩基配列を有する pTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1 および pTip-LCH2.1 の誘導性プロモーターを前記の TipA 遺伝子プロモーターの -10 領域配列の変異が CAGCGT 配列の TATAAT 配列への変異であるプロモーターに置換したベクターが挙げられる。なお、誘導型発現ベクターは TipA 遺伝子もしくはその変異体および TipA 遺伝子発現用プロモーターを含む誘導カセットならびにチオストレプトン耐性遺伝子も含んでいる必要がある。

### 【0023】

本発明の上記発現ベクターに外来遺伝子を組み込み、宿主微生物に導入し該宿主微生物を培養することにより、該外来遺伝子を発現させることができる。発現ベクターへの外来遺伝子の組み込みは公知の遺伝子工学的手法により行うことができる。宿主微生物への発現ベクターの導入も公知の手法で行うことができる。さらに、宿主微生物の培養も、それぞれの微生物に適合した培地を用いて適当な条件下で培養を行えばよい。ベクターを組み込む宿主生物としては、Rhodococcus 属細菌および大腸菌が挙げられる。ここで、外来遺伝子とは、本発明のベクターを用いて発現させようとする標的タンパク質をコードする遺伝子であり、宿主細胞以外の生物由来のタンパク質をコードする遺伝子をいう。本発明のベクターを用いて発現産生させるタンパク質は限定されず、いかなるタンパク質も対象となり得る。本発明の発現ベクターを導入する宿主生物が低温で増殖可能な微生物、例え

ば *R. erythropolis*、*R. fascians* および *R. opacus* 等の *Rhodococcus* 属細菌である場合、通常の微生物の増殖に適した温度条件、即ち約 15℃ を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質を発現産生させることができる。このようなタンパク質として、宿主細胞の至適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその微生物の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主微生物の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が 20℃ 以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質が挙げられる。

#### 【0024】

発現ベクターが含んでいるプロモーターが誘導型のプロモーターの場合、誘導物質の宿主微生物の培養系に添加することにより、外来遺伝子の発現産生を誘導することができる。本発明の発現ベクターが含む誘導型プロモーターとして、*Ti* *pA* 遺伝子プロモーターが挙げられ、該遺伝子プロモーターを含んでいる場合、チオストレプトンの添加により発現産生が誘導される。この際チオストレプトンは、終濃度 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以上、好ましくは 1  $\mu\text{g/ml}$  以上となるように添加すればよい。ただし、10  $\mu\text{g/ml}$  を越えると生育が悪くなる。また、本発明の発現ベクターが構成型のプロモーターを含んでいる場合は、誘導物質を添加することなく外来遺伝子が発現産生される。

#### 【0025】

本発明の発現ベクターのうち、自律複製に必要な DNA が互いに異なる発現ベク



ターは同一の微生物細胞に同時に共形質転換することにより、該細胞内で安定に維持され、それぞれのベクターが含んでいる外来遺伝子を同時に発現產生させることができる。この場合、それぞれのベクターが含んでいる外来遺伝子は同じタンパク質をコードするものでも、異なるタンパク質をコードするものでもよい。例えば、2つのサブユニットからなるタンパク質のそれぞれのサブユニットを自律複製に必要なDNAが互いに異なる別々の発現ベクターに組込んで、同一の微生物細胞に導入することにより、一つの細胞内で各サブユニットが同時に発現され、サブユニット同士が会合して完全なタンパク質が產生される。この際、発現ベクターは構成的に外来遺伝子を発現し得るもの、誘導的に発現し得るものの何れの組合わせを用いてもよいが、自律複製に必要なDNAが異なる複数の発現ベクターのすべてを誘導的に外来遺伝子を発現し得るものにし、発現誘導物質で発現誘導することにより、2種類以上の外来タンパク質を同時に発現產生させることができる。

#### 【0026】

さらに、本発明の発現ベクター中の大腸菌用複製起点について異なるものを選択することにより、大腸菌においても2種類のタンパク質を同時発現させることができる。

#### 【0027】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

##### 〔参考例1〕

(1) Rhodococcus erythropolis由来の、Rhodococcus属細菌内で自律複製可能なプラスミドの分離とその一部DNA配列の決定

Rhodococcus erythropolisと大腸菌の複合ベクターを作成するために、まずRhodococcus属細菌内に存在する小型の内在性プラスミドを検索した。すると、Rhodococcus erythropolis JCM2895 株にその存在が確認された。このプラスミドにpRE2895と名前を付けた。以下にプラスミドの分離と、そのDNA配列決定について具体的に述べる。

## 【0028】

Rhodococcus erythropolis JCM2895株を5 mlのLB培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、1.0% 塩化ナトリウム) にて、30 °Cで30時間培養した菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN社製) を用いてpRE2895を精製した。この際、Buffer P1 250  $\mu$ lに懸濁後、Buffer P2 250  $\mu$ lを加える前に、5  $\mu$ lのリゾチーム (100 mg/ml) を加え37 °Cで30分インキュベートした点を除いては、使用説明書通りに作業した。

## 【0029】

上記DNAサンプルを制限酵素EcoRIで処理し、1.0%アガロースゲル電気泳動 (100 V、30分) に供したところ、約5.4 kbのDNA断片 1本の存在が確認された。

## 【0030】

この約5.4 kbのDNA断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、使用説明書通りに精製した。得られたEcoRI断片を常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition [1989], Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従って、プラスミドpBluescript II SK (+) (STRATAGENE社製) のEcoRI部位にサブクローンし、このプラスミドにpHN79と名前を付けた。

## 【0031】

pHN79をReverse、M13-20両プライマー (共にSTRATAGENE社製) を用い、DNAシーケンサーABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer (ABI社製) を用いて、使用説明書に準じて、pHN79の塩基配列を約400塩基ずつそれぞれ決定した。相同性検索の結果、pHN79にサブクローンされたRhodococcus erythropolis JCM2895株由来のDNA領域はその99.8%の配列がGenBankに受入番号AF312210として登録されている5403塩基対の環状DNA、pN30と一致した。

## 【0032】

分離したpRE2895は全塩基配列を決定しなかったが、pN30との相同性は極めて高く、また制限酵素切断地図もpN30の配列から予想されるものと一致したことから、これらの相同性はプラスミド全体にわたっていると予想された。また、pN30はMycobacterium fortuitum 002株から分離された内在性プラスミドpAL5000 (R

auzer et al., Gene 71 315-321 [1988]、Stolt and Stoker, Microbiology 142 2795-2802 [1996])、Rhodococcus erythropolis NI86/21株から分離されたpFA J2600 (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 [1997])と相同性が高く、類似の機構で自律複製していると考えられた。pAL5000は推定RepA遺伝子、推定RepB遺伝子、推定複製開始点を含む領域のみで各細菌内で自律複製するために十分であるため、本発明者らが分離したpRE2895も同様の領域のみを発現ベクター中に組み込めば、Rhodococcus属細菌内で自律複製するために十分と考えられた。

### 【0033】

#### (2) ベクタープラスミドpHN136の構築

前記(1)で分離したpRE2895の一部と大腸菌内で自律複製可能なプラスミドの一部を用いて両菌の複合ベクターを作成するため以下の作業を行った(図1)。

### 【0034】

プラスミドpBluescript II SK (-) (STRATAGENE社製)をテンプレートとして、配列表中の配列番号1、2に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー(以下プライマーと略記)を用いて、ポリメラーゼチェーンリアクション法(以下、PCRと略記: Saiki et al., Science, 239 487-491 [1988])によるDNAの増幅を行った。なお、用いたPCR用の酵素はPfu turbo (STRATAGENE社製)である。その結果、アンピシリン耐性遺伝子(図中においてはAmp<sup>r</sup>と表記)と大腸菌内で自律複製させるために必要なColEI配列領域を含む2.0kbの増幅されたDNAを得た。このDNA断片を制限酵素SacIとBsrGIで二重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動(100 V、30分)に供し、該DNA断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて、使用説明書に準じて精製した。

### 【0035】

一方、pN30(前記(1))の配列をもとにRhodococcus属細菌内で自律複製するために必要と思われる領域を増幅するプライマーを設計した。なお、同プライマーの配列は配列表中の配列番号3、4で示される。プラスミドpHN79をテンプレートとして、両プライマーを用いてPCRによる増幅を行ったところ1.9 kbの増

幅されたDNAを得た。このDNA断片を制限酵素BsrGIとSacIで二重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動（100 V、30分）に供し、該DNA断片を切り出し、上述の方法と同様に精製した。

#### 【0036】

上記2つの精製されたDNA断片をDNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて、使用説明書通りにライゲーションし、得られたプラスミドにpHN129と名前を付けた。

#### 【0037】

次にpHN129に存在する制限酵素認識部位BamHI、SalIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、pHN129をテンプレートとして、配列表中の配列番号5、6に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。このPCR断片をBglIIとPstIで二重消化して得られた0.5 kbのDNA断片をpHN129のBamHI、PstI部位にサブクローンした。結果、BglIIとBamHIで連結された部分においては推定RepA遺伝子のオープンリーディングフレーム（以下ORFと略記）内であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI認識部位が除去された。またSalI認識部位はBamHI認識部位のごく近傍に存在したが、配列番号5に記載のプライマー中において、SalI認識部位が除かれ、かつ、コードされるアミノ酸が置換されないよう設計されていることから、BamHI認識部位と同時にSalI認識部位も除去されている。このプラスミドにpHN135と名前を付けた。

#### 【0038】

次にpHN135に存在する制限酵素認識部位BglIIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN135をテンプレートとして、配列表中の配列番号5、6に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。このPCR断片をPstIとBamHIで二重消化して得られた0.5 kbのDNA断片をpHN135のPstI、BglII部位にサブクローンした。結果、BamHIとBglIIで連結された部分においては推定RepB遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BglII認識部位が除去された。この結果得られたプラスミドにpHN136と名前をつけた。

#### 【0039】

(3) ベクタープラスミドpHN143の構築

タンパク質の発現誘導には抗生物質チオストレプトンを用いるが、Rhodococcus erythropolisは同物質に対して感受性であるために、耐性を付与させなければならない。そこでStreptomyces azureusが持つチオストレプトン耐性遺伝子、tsr遺伝子 (Bibb et al., Mol. Gen. Genet. 199 26-36 [1985]: 図中においては、Thio<sup>r</sup>と表記する) を複合ベクター中に組み込むこととした。なお、この遺伝子がRhodococcus erythropolis内で機能し、チオストレプトン耐性を付与することはすでに報告されている (Shao and Behki, Lett. Appl. Microbiol. 21 261-266 [1995])。以下に、同遺伝子の分離について具体的に述べる (図 2)。

#### 【0040】

まず、PCRのテンプレートに使用するStreptomyces azureus JCM4217株のゲノムDNAを以下のように調製した。5mlのSB培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% Glucose、5 mM塩化マグネシウム、0.5% グリシン) にて30 °Cで培養した同菌株を500  $\mu$ lのSETバッファー (75 mM 塩化ナトリウム、25 mM EDTA [pH8.0]、20 mM Tris-HCl[pH7.5]) に懸濁した。そこに、5  $\mu$ lのリゾチーム溶液 (100 mg/ml) を加え、37 °Cで30分インキュベートした。そして、14  $\mu$ lのプロテアーゼK溶液 (20 mg/ml) と60  $\mu$ lの硫酸ドデシルナトリウム溶液 (10%) を加え、よく混合した後55 °Cで2時間インキュベートした。その後、200  $\mu$ lの塩化ナトリウム溶液 (5 M) と500  $\mu$ lのクロロホルムを加え、20分間室温で回転撹拌した。遠心分離し、700  $\mu$ lの上清をとった。これをイソプロパノール沈殿後、乾燥させ、50  $\mu$ lのTE溶液 (10 mM Tris-HCl[pH8.0]、1 mM EDTA [pH8.0]) に溶解した。

#### 【0041】

上記のように精製したStreptomyces azureus JCM4217株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号7、8に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、チオストレプトン耐性遺伝子を含む1.1 kbの増幅されたDNAを得た。なおこのDNA断片はプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼ (Gibco BRL社製) を用いたため、その末端は平滑末端である。このDNA断片を精製し、常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition [1989], Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)

に従い5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミドpGEM-3Zf(+) (Promega社製) のHincII部位にサブクローンした(サブクローンされた向きはDNAの5'方向からHindIII認識部位-tsr遺伝子ORF-EcoRI認識部位である)。このプラスミドにpHN137と名前を付けた。

#### 【0042】

次にpHN137に存在する制限酵素認識部位SalIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN137をテンプレートとして、配列表中の配列番号9、10に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をHindIIIで消化して得られた0.6 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN137をテンプレートとして、配列表中の配列番号11、12に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をEcoRIで消化して得られた0.5 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のHindIII、EcoRI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはtsr遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI認識部位が除去された。このプラスミドにpHN143と名前を付けた。

#### 【0043】

##### (4) ベクタープラスミドpHN62の構築

チオストレプトンによって誘導型発現をさせるためにはRhodococcus属細菌内にTipAタンパク質を存在させなければならない。そのために、Rhodococcus erythropolisから構成的なプロモーターを分離し、その下流にTipAタンパク質をコードする構造遺伝子を連結した(図3)。構成的に機能するプロモーターとしてはRhodococcus erythropolisのアルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードするThcA遺伝子(Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 [1995])のプロモーター配列を用いた。

## 【0044】

テンプレートに使用するStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAはStreptomyces azureusからゲノムDNAを調製したときと同様に作業し、精製した。また、Rhodococcus erythropolis JCM3201株のゲノムDNAは5 mlのLB培地で培養した点を除いてはStreptomyces azureusからゲノムDNAを調製したときと同様に作業し、精製した。

## 【0045】

上述のように精製したStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号13、14に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。その結果、TipA遺伝子のORF並びにその下流の転写終結配列を含むDNA（図中においてはTipAと表記）を得た。

## 【0046】

このPCR断片の片方の末端をBglIIで消化して得られた0.9 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、上述のように精製したRhodococcus erythropolis JCM3201株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号15、16に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、アルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードするThcA遺伝子 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 [1995]) のプロモーター配列（図中においてはALDHpと表記）を含むDNAを得た。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXbaIで消化して得られた0.2kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、BamHI部位にサブクローンした結果、ThcA遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にTipA遺伝子のORF並びに転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN33と名前を付けた。

## 【0047】

次にpHN33に存在する制限酵素NcoI認識部位2カ所（以下、NcoI(1)、NcoI(2)と表記する）を除去するため以下の作業をおこなった。

## 【0048】

まず、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号9、17に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXbaIで消化して得られた0.5 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号18、12に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をKpnIで消化して得られた0.6 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、KpnI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはTipA遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、NcoI(1)認識部位が除去された。このプラスミドにpHN50と名前を付けた。

## 【0049】

次にpHN33に存在する制限酵素認識部位NcoI(2)を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号9、19に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXbaIで消化して得られた0.8 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号20、12に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をKpnIで消化して得られた0.3 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、KpnI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはTipA遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、NcoI(2)認識部位が除去された。このプラスミドにpHN51と名前を付けた。



## 【0050】

最後に以下の作業を行った。pHN50をXbaIとSacIで二重消化して得られた0.7kbのDNA断片とpHN51をSacIとKpnIで二重消化した0.4kbの断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、KpnI部位にサブクローンした。結果、NcoI(1)とNcoI(2)両方の制限酵素部位を欠いたTipA遺伝子を持つプラスミドを取得し、これにpHN62と名前をつけた。

## 【0051】

## (5) ベクタープラスミドpHN153の構築

目的のタンパク質を誘導的に発現せしめることができるかどうか確認するために、TipA遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてThermoplasma acidophilum由来のプロリンイミノペプチダーゼ (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 [1996]: 以下PIPと略記する) をコードする遺伝子のORF (図中においてはPIP ORFと表記) を連結し、さらにその下流に転写のリードスルーを抑制するために転写終結配列を連結した。以下に具体的に述べる (図4)。

## 【0052】

前記(4)にて精製したStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号21、22に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子のプロモーター配列 (図中においてはTipApと表記) を含む0.2 kbの増幅されたDNAを得た。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミドpBluescript IISK (+)のSmaI部位にサブクローンした (サブクローンされた向きはDNAの5'方向からKpnI認識部位-TipA遺伝子プロモーター配列-SacI認識部位である)。このプラスミドにpHN150uと名前を付けた。

## 【0053】

次に、プラスミドpRSET-PIP (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 [1996]: 以下PIPと略記する) をテンプレートとして、配列表中の配列番号23、24に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なお、配列表中の配列番号24のプライマーはPIP遺伝子の終止コドンを除いて、かつタンパク質の

精製を容易にするために6×HisタグがPIPタンパク質のC末端に付くように設計されている。6×Hisタグは、6つの連続したヒスチジン残基から成る連続配列で、これを融合したタンパク質は、ニッケルイオン等に高い親和性を示すようになる。従って、ニッケルイオン等を用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製が容易になる (Crowe et al., Methods Mol. Biol. 31 371-387 [1994])。このPI P遺伝子を含む0.9 kbのDNA断片を制限酵素NcoIとSpeIで二重消化し、pHN150uのNcoI、SpeI部位にサブクローンした結果、TipA遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にPIP遺伝子のORFを含むプラスミドが作成され、pHN151uと名前を付けた。

#### 【0054】

次に、前記(4)にて精製したRhodococcus erythropolis JCM3201株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号25, 26に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、ThcA遺伝子の転写終結配列 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 [1995]: 図中においてはALDHtと表記)を含むDNAを得た。この0.2kbのDNA断片を制限酵素SpeIとXbaIで二重消化し、pHN151uのSpeI、XbaI部位にサブクローンした。その結果、TipA遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にPIP遺伝子のORFを含み、またそのすぐ下流にThcA遺伝子の転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN153と名前を付けた。

#### 【0055】

##### (6) ベクタープラスミドpHN169の構築

Rhodococcus erythropolisをプラスミドで形質転換するためには適当な形質転換マーカーが必要になる。そこでRhodococcus属細菌内で機能する強力なプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を連結し、使用することとした。プロモーターとしては、Streptomyces属細菌由来の Elongation factor TuをコードするTuf1遺伝子プロモーターを用いることとしたが、これは同プロモーターが強力に下流の遺伝子を転写せしめるとの報告があるからである (Wezel et al., Biochim. Biophys. Acta 1219 543-547 [1994])。また、薬剤耐性遺伝子は入手が容易なテトラサイクリン耐性遺伝子を用いた。以下に具体的に述べる (図5)。

#### 【0056】

前記(4)にて精製したStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAをテン

プレートとして、配列表中の配列番号 27、28 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、Tuf1 遺伝子のプロモーター配列（図中においては Tuf1p と表記）を含む 0.2 kb の増幅された DNA を得た。なおこの PCR には Platinum Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pBluescript II SK (+) の HincII 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から KpnI 認識部位-Tuf1 遺伝子プロモーター配列-EcoRI 認識部位である）。このプラスミドに pHN158 と名前を付けた。

#### 【0057】

次に、プラスミド pACYC184 (Rose, Nucleic Acids Res. 16 355 [1988]) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 29、30 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、テトラサイクリン耐性遺伝子（図中においては Tet<sup>r</sup> と表記）を含む DNA を得た。この 1.3kb の DNA 断片を制限酵素 XhoI と SpeI で二重消化し、pHN158 の SalI、SpeI 部位にサブクローンした結果、Tuf1 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にテトラサイクリン耐性遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN159 と名前を付けた。

#### 【0058】

次に pHN159 に存在する制限酵素認識部位 BamHI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表 31、32 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの DNA 断片は Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いたため、その末端は平滑末端である。この PCR 断片の片方の末端を XhoI で消化して得られた 0.5 kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 33、34 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を NotI で消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pBluescript II SK (+) の XhoI、NotI 部位にサブクローンした結果、平

滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI部位が除去された。このプラスミドにpHN165と名前を付けた。

#### 【0059】

次にpHN159に存在する制限酵素認識部位SalIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN159をテンプレートとして、配列表中の配列番号31、35に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはPfu turbo DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXhoIで消化して得られた0.8 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN159をテンプレートとして、配列表中の配列番号36、34に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはPfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をNotIで消化して得られた0.8 kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpBluescript II SK (+) のXhoI、NotI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI認識部位が除去された。このプラスミドにpHN166と名前を付けた。

#### 【0060】

最後に以下の作業を行った。pHN166をSphIとSpeIで二重消化して得られた0.9 kbのDNA断片をpHN165のSphI、SpeI部位にサブクローンした。結果、BamHIとSalI両方の制限酵素認識部位を欠くテトラサイクリン耐性遺伝子クローンを取得し、このプラスミドにpHN169と名前をつけた。

#### 【0061】

##### (7) ベクタープラスミドpHN170、pHN171の構築

前記(2)から(6)までに分離してきた遺伝子群を連結し、Rhodococcus属細菌内で誘導可能な発現ベクターを構築するために以下の作業を行った(図6)

。

## 【0062】

pHN143をSacIで消化して得られた1.1 kbのDNA断片をpHN136のSacI部位にサブクローンした（サブクローンされた向きはDNAの5'方向から推定RepB遺伝子ORF-tsr遺伝子ORF-アンピシリン耐性遺伝子ORFである）。その結果できたプラスミドにpHN144と名前をつけた。

## 【0063】

次に、pHN62をXbaIとKpnIで二重消化して得られた1.1 kbのDNA断片をpHN144のXbaI、KpnI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN152と名前をつけた。

## 【0064】

次に、pHN153をBsrGIとXbaIで二重消化して得られた1.2 kbのDNA断片をpHN152のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN154と名前をつけた。

## 【0065】

次に、pHN169をXbaIとSpeIで二重消化して得られた1.6 kbのDNA断片をpHN154のXbaI部位にサブクローンした（サブクローンされた向きはDNAの5'方向からtsr遺伝子ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子ORF-ThcA遺伝子プロモーター配列である）。その結果TipA遺伝子プロモーターの制御下に置かれたPIP遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドにpHN170と名前をつけた。

## 【0066】

また組み換えタンパク質の高発現化のため、TipA遺伝子プロモーター下流のリボソーム結合部位を翻訳効率の良いとされるラムダファージgene10由来の配列（Gold and Stormo, Methods Enzymol. 185 89-93 [1990]）に変化させた（図6）。以下に具体的に述べる。

## 【0067】

プラスミドpHN170をテンプレートとして、配列表中の配列番号21, 37に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターとラムダファージgene10由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドプロモーター（以下TipA-LG10プロモーターと表記する：図中に置いてはTipA-LG

10pと表記)を得た。この0.2 kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとNcoIで二重消化し、pHN170のBsrGI、NcoI部位にサブクローンした。その結果TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたPIP遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドにpHN171と名前をつけた。図12にTipAプロモーター配列を、図13にTipAプロモーターのTipA-LG10プロモーターへの改変のためのリボソーム結合部位(RBS)配列の改良を示す。

#### 【0068】

(8) ベクタープラスミドpTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1の構築  
前記(7)で述べたプラスミドからレポーターであるPIP遺伝子を除き、マルチクローニング部位を導入するため以下の作業を行った(図7)。

#### 【0069】

配列表中の配列番号38、39に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら2つを等モル量ずつ混合し、70℃で10分処理し、20分かけて室温に冷却し、2本鎖化させた。その結果、その末端はNcoIとSpeIで二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この2本鎖化した合成DNA(図中においてはMCS Linker NNcoと表記)をpHN170のNcoI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-NH1と名前をつけた。また、配列表中の配列番号40、41に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド(マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ)を同様に2本鎖化させた合成DNA(図中においてはMCS Linker CNcoと表記)をpHN170のNcoI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-CH1と名前をつけた。

#### 【0070】

前記(7)で述べたTipA遺伝子プロモーター配列とラムダファージgene10由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドDNAを制限酵素BsrGIとNcoIで二重消化し、pTip-NH1とpTip-CH1のBsrGI、NcoI部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LNH1、pTip-LCH1とそれぞれ名前を付けた。

#### 【0071】

(9) ベクタープラスミドpTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2の構築

前記(8)で述べたプラスミドpTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1において、マルチクローニング部位の最も上流のNcoI部位をNdeIに変更するために以下の作業を行った(図8)。

#### 【0072】

プラスミドpHN170をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、42に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターを含むDNAを得た。この0.2 kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとNdeIで二重消化し、pHN170のBsrGI、NdeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpHN183と名前を付けた。

#### 【0073】

配列表中の配列番号43、44に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら2つを等モル量ずつ混合し、70℃で10分処理し、20分かけて室温に冷却し、2本鎖化させた。その結果、その末端はNdeIとSpeIで二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この2本鎖化した合成DNA(図中においてはMCS Linker NNdeと表記)をpHN183のNdeI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-NH2と名前をつけた。また、配列表中の配列番号45、46に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド(マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ)を同様に2本鎖化させた合成DNA(図中においてはMCS Linker CNdeと表記)をpHN183のNdeI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-CH2と名前をつけた。

#### 【0074】

プラスミドpTip-LNH1をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、47に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターとラムダファージgene10由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドDNAを得た。この0.2kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとNdeIで二重消化し、pTip-NH2とpTip-CH2のBsrGI、NdeI部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LNH2、pTip-LCH2とそれぞれ名前を付けた。

#### 【0075】

前記(8)、(9)で作成したプラスミドのマップと、マルチクローニング部位周辺の配列をまとめて図9に示す。該図中、実線の矢印はTipA遺伝子プロモーター中に存在するInverted repeat配列を示す。斜線の矢印はThcA遺伝子転写終結配列に存在するInverted repeat配列を示す。また、原核生物のプロモーター領域に一般的に存在し、遺伝子の転写に重要な-10領域、-35領域、RBSは四角で囲んである。またRBSの中でも最も重要なSD配列(Shine and Dalgarno, Eur. J. Biochem. 57 221-230 [1975])は下線を引いてある。

#### 【0076】

(10) ベクタープラスミドpTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1の構築

前記(8)及び(9)で述べたプラスミドpTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2において、マルチクローニング部位のXhoI部位以降の読み枠を市販のpETベクター(Novagen社)の読み枠と一致させるために以下の作業を行った(図10)。

#### 【0077】

プラスミドpTip-CH1をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、48に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターとマルチクローニング部位を含むDNAを得た。この0.3 kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-CH1.1と名前を付けた。

#### 【0078】

プラスミドpTip-CH2をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、48に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターとマルチクローニング部位を含むDNAを得た。この0.3 kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-CH2.1と名前を付けた。

#### 【0079】

プラスミドpTip-LCH1をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、48に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA-LG10プ



ロモーターとマルチクローニング部位を含むDNAを得た。この0.3kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LCH1.1と名前を付けた。

#### 【0080】

プラスミドpTip-LCH2をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、48に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA-LG10プロモーターとマルチクローニング部位を含むDNAを得た。この0.3 kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LCH2.1と名前を付けた。

#### 【0081】

##### (11) ベクタープラスミドpHN172、pHN173の構築

発現の誘導が厳密に調節されているかを調べるために以下のようなコントロール実験用プラスミドを作成した(図11)。

#### 【0082】

pHN169をXbaIとSpeIで二重消化して得られた1.6 kbのDNA断片をpHN144のXbaI部位にサブクローンした(サブクローンされた向きはDNAの5'方向からtsr遺伝子ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子ORF-アンピシリン耐性遺伝子ORFである)。その結果できたプラスミドにpHN172と名前をつけた。

#### 【0083】

次に、pHN153をBsrGIとXbaIで二重消化して得られた1.2 kbのDNA断片をpHN144のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN164と名前をつけた。次いで、pHN169をXbaIとSpeIで二重消化して得られた1.6kbのDNA断片をpHN164のXbaI部位にサブクローンした(サブクローンされた向きはDNAの5'方向からtsr遺伝子ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子ORF-アンピシリン耐性遺伝子ORFである)。その結果できたプラスミドにpHN173と名前をつけた。

#### 【0084】

pHN170は、TipA遺伝子プロモーター、その下流にPIP ORF、さらにその下流にThcA遺伝子転写終結配列、の3因子が連結された遺伝子カセット(以下Expression cassetteと表記)と、ThcA遺伝子プロモーター、その下流にTipA遺伝子、の2

因子が連結された遺伝子カセット（以下Inducer cassetteと表記）両方をもつ。  
pHN173はExpression cassetteのみをもち、pHN172は両cassetteを持たない。

### 【0085】

#### (12) Rhodococcus属細菌の形質転換

Rhodococcus erythropolis JCM3201株をLB培地100 mlにて対数増殖期に至るまで30℃で振とう培養する。培養液を30分間氷冷し、遠心分離し、菌体を回収する。これに100 mlの氷冷滅菌水を加え、よく攪拌し、再び遠心分離し、菌体を回収する。これに100 mlの氷冷10%グリセリン溶液を加え、よく攪拌し、遠心分離し、菌体を回収する。この氷冷10%グリセリン溶液での洗浄をもう一度繰り返す。菌体を5 mlの氷冷10%グリセリン溶液に懸濁する。400  $\mu$ lずつ分注し、液体窒素で瞬間冷凍し、使用するまで-80℃にて保存した。-80℃から菌体を取り出し、氷上にて融解し、プラスミドpHN170、またはpHN172、またはpHN173を3  $\mu$ l（それぞれ約300 ng）加えた。この菌体とDNAの混合液をエレクトロポレーションキュベット（Bio-Rad社:0.2 cm ギャップキュベット）に移し、同社の遺伝子導入装置ジーンパルサーIIを用いて、電場強度12.5 kV/cmで、パルスコントローラーの設定はキャパシタンス25  $\mu$ F、外部抵抗400  $\Omega$ にてそれぞれ電気パルスを与えた。電気パルス処理した菌体とDNAの混合液を1 mlのLB培地に混合し、30℃にて4時間培養した後集菌し、20  $\mu$ g/mlテトラサイクリン入りLB寒天培地（寒天は濃度1.8%）に塗布し、30℃にて3日培養し、それぞれの形質転換体を得た。

### 【0086】

#### 〔実施例1〕

##### 実験方法

まず、以下の実施例2から実施例12に書かれた実験に用いた手法を列挙する。

プラスミドは全て、常法（Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition [1989], Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）に従って構築した。ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCRと略記；Saiki et al., Science 239 487-491 [1988]）には全てPfu turbo（STRATAGENE社製）を用いた。プラスミドから切り出したDNA断片は1

.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的のDNA断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen社製) を用いて、使用説明書に準じて精製した。Streptomyces coelicolor A3(2)株、R. erythropolis DSM313株のゲノムDNAの分離法、並びにRhodococcus属細菌からのプラスミドDNAの精製方法は参考例1に記載したものと同一である。大腸菌ER2508株 (New England Biolabs社) のゲノムDNAはQIAGEN社製QIAGEN RNA/DNA Mini Kitを用い、使用説明書に準じて精製した。DNA断片の5'末端をリン酸化する必要がある場合は東洋紡社製T4 polynucleotide kinaseを用いた。塩基配列決定にはDNAシーケンサーABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer (ABI社製) を用いた。リガーゼ反応にはNew England Biolabs社製のT4 DNA ligaseを用いた。

#### 【0087】

用いた主なプラスミド、菌株を表1, 2に示す。Rhodococcus属細菌、Streptomyces coelicolor A3(2)株、大腸菌の培養はLuria Broth (LB; 1% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 1% 塩化ナトリウム) で行った。Rhodococcus属細菌のコンピテントセル作成法、並びに形質転換法は参考例1に記されているが、予めプラスミドを保持しているRhodococcus属細菌のコンピテントセルを作成する際には、適当な抗生物質を含んだLB培地で培養した菌体から行った。形質転換体を選択する際には、テトラサイクリン (液体培地では、 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 、固体培地では $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )、クロラムフェニコール ( $34\mu\text{g}/\text{ml}$ )、アンピシリン ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用いた。

#### 【0088】

誘導型ベクターを用いてProline iminopeptidase (以下PIP) または、蛍光緑色タンパク質 (以下GFP) をRhodococcus属細菌にて発現させる際には、Rhodococcus属細菌の形質転換体を適当な抗生物質を含むLB培地で $30^\circ\text{C}$ にて培養し、 $600\text{nm}$ の波長で測定したオプティカルデンシティー (O.D.600) が0.6になった時点で、終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにチオストレプトン (溶媒はジメチルスルホオキシド) を加え、さらに16時間培養を続けた。構成型ベクターを用いて発現させる際には、Rhodococcus属細菌の形質転換体を適当な抗生物質を含むLB培地で $30^\circ\text{C}$ にてO.D.600が2.0になるまで培養した。

## 【0089】

PIPのペプチダーゼ活性を測定する方法を以下に詳述する。上記のようにPIPを発現させたRhodococcus属細菌の培養液を、8  $\mu\text{g} / \text{ml}$ の適当な抗生物質を含むLB培地で200  $\mu\text{l}$ にメスアップし、60  $^{\circ}\text{C}$ にて1分加温する。そこにPIPの基質として2  $\mu\text{l}$ のH-Pro- $\beta$ NA (100 mM; 溶媒はジメチルスルホキシド) を加え60  $^{\circ}\text{C}$ にて20分インキュベートする (PIPは60  $^{\circ}\text{C}$ が至適温度)。PIPによってH-Pro- $\beta$ NAから加水分解されて遊離した $\beta$ NAを観察するために、発色剤として134  $\mu\text{l}$ のFast Garnet GBC Salt 溶液 (和光純薬社製で濃度0.5 mg / ml : 1 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.2)、10% Triton X-100が溶媒) を加える。PIPが発現していなければ上記混合液は黄色を呈するが、発現していれば赤色を呈する。また、呈色した赤色を吸光分光光度計を用い、550 nmでの吸光度 (A550) を測定し、PIP活性を定量した。測定はFast Garnet GBC Saltを加えた後、滅菌水666  $\mu\text{l}$ を加え希釈して行った。

## 【0090】

その際、550 nmでは細胞のオプティカルデンシティーも測定してしまうので、550 nmでの細胞のオプティカルデンシティー (O.D.550) は別測定し、測定時に使用したO.D.550に相当する値をA550の値から差し引いて補正した値をAc550とする。すなわち、 $\text{Ac550} = \text{A550} - \text{O.D.550} \times \text{PIPの活性測定に使用した培養液量 (ml)}$ で計算される。ユニット値は「20分間の測定で得られる、培養液1 mlあたり、O.D.600=1あたりのAc550の値」とし、「 $\text{Ac550} \div \text{PIPの活性測定に使った培養液量 (ml)} \div \text{O.D.600}$ 」で計算した。

## 【0091】

## 〔実施例2〕

R. erythropolisに存在する新規内在性プラスミドpRE8424の分離

本発明者はR. erythropolisに存在する新規内在性プラスミドを探索し、R. erythropolis JCM2893、R. erythropolis JCM2894、R. erythropolis DSM43200、R. erythropolis DSM8424の4株から小型の環状プラスミドを分離し、それぞれpRE2893、pRE2894、pRE43200、pRE8424と名前を付けた。

## 【0092】

これらのうち、pRE2893、pRE2894、pRE43200のDNA配列を一部決定したところ、本発明者が以前にR. erythropolis JCM2895株から分離していたpRE2585（参考例1を参照）とはほぼ同一の配列を有していた。pRE2895はプラスミドの複製に関与するRepA、RepBタンパク質をコードする遺伝子をRepABオペロンとして有しているが、これらのタンパク質はMycobacterium fortuitumから分離されたpAL5000プラスミドがコードするRepA、RepBタンパク質と高度に類似しており、pRE2895とpAL5000が類似の様式で自律複製していることが示唆された（Stolt and Stoker, *Microbiology* 142 2795-2802 [1996], 参考例1）。pRE2895とpAL5000の複製様式は明らかでないが、両プラスミドのRepAタンパク質がColE2プラスミドのRepタンパク質に相同性があるため、ColE2プラスミド同様「 $\theta$ 型」の自律複製様式を有することが考えられた（Hiraga et al., *J. Bacteriol.* 176 7233-7243 [1994]）。

#### 【0093】

一方、pRE8424はpRE2585と全く異なるDNA配列を有していた（配列表中の配列番号90、図1）。このプラスミドは6つのオープンリーディングフレーム（ORF；ORF1からORF6）を持ち、うちORF6がコードするタンパク質（図14）はローリングサークル様式で自律複製する一群のプラスミドが持つRep遺伝子がコードするタンパク質と相同性が高かった（Khan, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 442-455 [1997]）。中でも、Arcanobacterium pyrogenes由来pAP1（Billington et al., *J. Bacteriol.* 180 3233-3236 [1998]）、Streptomyces lividans由来pIJ101（Kendall et al., *J. Bacteriol.* 170 4634-4651 [1988]）、Streptomyces phaeochromogenes由来pJV1（Servin-Gonzalez et al., *Microbiology* 141 2499-2510 [1995]）、Brevibacterium lactofermentum由来pBL1（Fernandez-Gonzalez et al., *J. Bacteriol.* 176 3154-3161 [1994]）、Streptomyces nigrifaciens由来pSN22（Kataoka et al., *Plasmid* 32 55-69 [1994]）と相同性が高かった（図15）。これらのプラスミドは、いずれもローリングサークル型プラスミドの中でもpIJ101/pJV1ファミリーに属するもので（Khan, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 442-455 [1997]）、pRE8424もこのファミリーに属するローリングサークル型プラスミドである可能性が示唆された。以下、ORF6はRepと記載する。

## 【0094】

一般に、ローリングサークル型プラスミドが宿主細胞内で自律複製するためには、前出のRepの他に、2本鎖複製起点 (double-stranded origin; 以下DSO)、1本鎖複製起点 (single-stranded origin; 以下SSO) となるDNA配列が必要である。本発明者は様々なpRE8424の変異体を作成し、R. erythropolisを形質転換し、様々な解析を行い、DSO、SSO配列の所在を同定した (図14)。DSOは配列表中の配列番号90のうちヌクレオチド番号5514から5970内に存在すると考えられたが、他のローリングサークル型プラスミドのDSO配列との比較から、配列表中の配列番号90のヌクレオチド番号5705から5734の配列が最もDSOの機能に重要だと考えられた (図16)。また、同定したSSO配列を図17に示す。SSO配列は一般に、ステム - ループ構造など高度な二次構造を持ち、さらに、pIJ101/pJV1ファミリーのプラスミドの場合、ステム - ループ構造のループ部分にTAGCGTなどからなる共通配列が存在するケースが多い。pRE8424のSSOも高度な二次構造を持ち、ループ部分にTAGCGG配列を持つ (図17)。

## 【0095】

本発明者は、上記TAGCGGに変異を持つpRE8424の派生プラスミドがR. erythropolis細胞内に大量に一本鎖DNAとして蓄積していたことを見いだした。一本鎖DNAの蓄積はローリングサークル型プラスミドのホールマークであることから (Khan, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61 442-455 [1997])、pRE8424はローリングサークル様式で自律複製していることが明らかとなった。

## 【0096】

pRE8424の派生プラスミドが宿主細胞であるR. erythropolis内で自律複製するためには、Rep、DSO、SSOを含む2.0 kbの領域、すなわち配列表中の配列番号90のうちヌクレオチド番号3845から5849までの領域、で十分であった (以下の実施例3参照)。

## 【0097】

図14はpRE8424のマッピングを示す。図14中には主な制限酵素認識部位が示されていて、6つのORFが矢印で示されている。DSOとSSOの位置が四角で示されている。

## 【0098】

図15はpRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22のRepタンパク質の5カ所の保存された領域 (Motif IV、Motif I、Motif II、Motif III、C-terminal motif; Billington et al., J. Bacteriol. 180 3233-3236 [1998]参照) のアミノ酸配列を示す。数字は各領域間に存在するアミノ酸残基の数、即ちギャップのアミノ酸残基の数を示す。完全に保存されたアミノ酸残基は星(\*)、高度に保存された領域は2つの点(:)、比較的保存された領域は1つの点(.)で示した。Repタンパク質の機能に重要とされるチロシン残基は四角で囲ってある。

## 【0099】

図16はpRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22のDSOと考えられる配列のうち、特に保存されたDNA部分を示す。更にDSOの機能に特に重要なGGジヌクレオチドは下線を引いてある (Billington et al., J. Bacteriol. 180 3233-3236 [1998]参照)。

## 【0100】

図17はpRE8424のSSO、即ち配列表中の配列番号90のうちヌクレオチド番号5268から5538の配列と、その取りうる二次構造を示した。二次構造の予測はmfold program, version 3.0 (Michael Zuker, Washington University, St. Louis, Mo.; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/form1.cgi>) によって行った。上述のTAGCGG配列を黒丸で示した。

## 【0101】

## 〔実施例3〕

## pHN372の構築

pRE8424の自律複製に必須な2.0 kbの領域には、不必要な制限酵素認識部位BamHIが存在していたので、これを除去する作業を以下のように行った。

## 【0102】

pRE8424をテンプレートとし、配列表中の配列番号57 (sHN389)、58 (sHN390) に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー (以下プライマーと略記) を用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた1.0 kbの断片はRepの5'末端側の一部を含む。この断片の5'末端をリン酸化し、pBluescript II SK

(+) (STRATAGENE社製) のHincII部位に導入し、できたプラスミドにpHN371と名前を付けた。pRE8424をテンプレートとし、配列表中の配列番号59 (sHN391)、60 (sHN321) に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた1.0 kbの断片はRepの3'末端側の一部を含む。この断片をBamHIで消化した後、5'末端をリン酸化し、pHN371のEcoRV / BglII部位に導入した。できたプラスミドにpHN372と名前を付けた。pHN372は、pRE8424の自律複製に必須な2.0 kbの領域を持ち、かつ、pRE8424には存在したBamHI部位は除去されている。また、BamHI部位の除去は、pRE8424の自律複製の機能には影響しなかった。

### 【0103】

#### 〔実施例4〕

#### pHN346の構築

Rhodococcus属細菌の形質転換体選択マーカーとして、参考例に示すベクターの構築においてはテトラサイクリン耐性遺伝子のみ開発していたが、複数のプラスミドで形質転換するためには、別の抗生物質に対する耐性遺伝子を新規に開発する必要がある。本発明者は、R. erythropolis DSM 313株がクロラムフェニコールに対して耐性を有していることを見だし、耐性を付与している遺伝子を分離することとした。Rhodococcus属細菌からは、すでに2つのクロラムフェニコール耐性遺伝子が分離されており (cmrA遺伝子、ならびにcmr遺伝子)、これらの遺伝子は互いに高い相同性を有している (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 [1997]、Desomer et al., Mol. Microbiol. 6 2377-2385 [1992])。

### 【0104】

R. erythropolis DSM 313株のクロラムフェニコール耐性遺伝子もこれらに相同であることが予想されたので、R. erythropolis DSM 313株ゲノムDNAをテンプレートとし、配列表中の配列番号61 (sHN335)、62 (sHN336) に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。なお、該プライマーはcmrA遺伝子とcmr遺伝子において最も相同性が高かった配列をもとにデザインした。その結果、0.7 kbの増幅されたバンドが確認された。このPCR産物のDNA配列を決定したところ、cmrA遺伝子に極めて高い相同性を有していた。決定された配列を元に、配列表中の配列番号63 (sHN349)、64 (sHN351) に記載のプライマーを設



計し、インバースPCR (Ochman et al., Genetics 120 621-623[1988]) にて R. erythropolis DSM 313株のクロラムフェニコール耐性遺伝子の全長を分離した。テンプレートとして用いたDNAは R. erythropolis DSM313株のゲノムDNA 0.1  $\mu$ g を SalI で切断し、リガーゼにより自己閉環化したものである。得られたPCR産物は2.3 kbで、この断片の全DNA配列を決定した。この断片中には1つのORFが存在し、この遺伝子に Ch1A と名前を付けた (図中ではCh1rと表記)。

#### 【0105】

R. erythropolis DSM 313株ゲノムDNAをテンプレートとし、配列表中の配列番号65 (sHN361)、66 (sHN362) に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた0.5 kbの断片はクロラムフェニコール耐性遺伝子の5'末端部分を含む。この断片を SacI で消化し、その5'末端をリン酸化した。一方、R. erythropolis DSM 313株ゲノムDNAをテンプレートとし、配列表中の配列番号67 (sHN363)、68 (sHN364) に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた1.3 kbの断片はクロラムフェニコール耐性遺伝子の3'末端部分を含む。この断片を SpeI で消化し、その5'末端をリン酸化した。これら2つのDNA断片を同時にpBluescript II SK (+)の SacI / SpeI 部位に導入し、できたプラスミドにpHN346と名前を付けた。pHN346は全長のクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むが、該ORF中にもともと存在していた EcoRI 部位が除かれている (ただし、コードするタンパク質のアミノ酸配列は変化しない)。

#### 【0106】

##### 〔実施例5〕

Proline iminopeptidase (PIP) をレポーター遺伝子として有する誘導型発現ベクターの構築; pHN171、pHN379、pHN348、pHN380の構築

pHN346 (実施例4) から1.8 kbのクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む断片を XbaI と SpeI で切り出し、pHN154 (特願2002-235008) の XbaI 部位に導入した。この結果できたプラスミドにpHN347と名前を付けた。pHN171 (参考例を参照) から1.1 kbの断片を BsrGI と SpeI で切り出し、pHN347の BsrGI / SpeI 部位に導入した。出来たプラスミドにpHN348と名前を付けた。

#### 【0107】

pHN171もpHN348もpTipベクター（参考例を参照）のMCSにレポーター遺伝子、PIPが導入された発現ベクターであるが、pHN171がテトラサイクリン耐性遺伝子、形質転換マーカーとして持つのに対して、pHN348がクロラムフェニコール耐性遺伝子を持っていることのみが異なる。また、いずれのプラスミドもTipA遺伝子プロモーターの下流に元来存在していたリボソーム結合部位配列（TipA-RBS）は翻訳効率の良い、バクテリオファージgene 10由来のリボソーム結合部位配列に変更されている（TipA-LG10プロモーター；参考例を参照）。PIPのCの末端側には、タンパク質の精製を容易にするために6×Hisタグが付くように設計されている。6×Hisタグは、6つの連続したヒスチジン残基から成る連続配列で、これを融合したタンパク質は、ニッケルイオン等に高い親和性を示すようになる。従って、ニッケルイオン等を用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製が容易になる（Crowe et al., Methods Mol. Biol. 31 371-387 [1994]）。

#### 【0108】

上述のpHN171とpHN348のDNA配列のうち、pRE2585に由来するプラスミドの自律複製に必須な1.9 kbの領域を、pRE8424に由来するプラスミドの自律複製に必須な2.0 kbの領域に変更するために以下の作業を行った。

#### 【0109】

pHN171をテンプレートとし、配列表中の配列番号69（sHN368）、70（sHN373）に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた0.2 kbの断片はチオストレプトン耐性遺伝子（tsr遺伝子；図中ではThiorと表記）（Bibb et al., Mol. Gen. Genet. 199 26-36 [1985]）の5'末端部分を含む。この断片をBsrGIとClaIで消化し、pHN171とpHN348のBsrGI / ClaI部位にそれぞれ導入した。この結果出来たプラスミドにそれぞれpHN357とpHN358と名前を付けた。pHN372（実施例3）から2.0 kbのpRE8424に由来するプラスミドの自律複製に必須な領域を含む断片をBsrGIとHpaIで切り出し、pHN357とpHN358のBsrGI / HpaI部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドにpHN379、pHN380とそれぞれ名前を付けた。

#### 【0110】

〔実施例6〕

### pTipベクターの構築

pHN171、pHN348、pHN379、pHN380（実施例5）のPIP遺伝子の代わりに、MCSを導入し、8種類のpTipベクターを構築した過程を示す。なお、今回作成した、pTipベクターのうち、4つ（pTip-RT1、pTip-RT2、pTip-RC1、pTip-RC2；後述）は、参考例1に記載のpTipベクターとは、Rhodococcus属細菌でプラスミドが自律複製するのに必要なDNA領域が異なり、参考例1に記載のpTipベクター全てとRhodococcus属細菌内での不和合性を起こさない（後述）。また、残りの4つ（pTip-QT1、pTip-QT2、pTip-QC1、pTip-QC2；後述）は、参考例1に記載のpTipベクターとはMCSの配列が一部異なっている。

#### 【0111】

配列表中の配列番号71、72に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはMCS部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら2つを等モル量ずつ混合し、70℃で10分処理し、20分かけて室温に冷却し、2本鎖化させた（MCS type 1）。その結果、その末端はNcoIとSpeIで二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この2本鎖化した合成DNAをpHN379、pHN380のNcoI / SpeI部位にそれぞれサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-RT1、pTip-RC1とそれぞれ名前をつけた。配列表中の配列番号73、74に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドを同様に2本鎖化させ（MCS type 2）、一方、pTip-LNH2（参考例1を参照）から0.2 kbのTipA遺伝子プロモーターとLG10-RBSを含む断片をBsrGIとNdeIで切り出した。これら2つのDNA断片を同時に、pHN379とpHN380のBsrGI / SpeI部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドにpTip-RT2、pTip-RC2と名前を付けた。pTip-RT1から0.3 kbのTipA遺伝子プロモーター、LG10-RBS、MCS type 1を含む断片をBsrGIとSpeIで切り出し、pHN171とpHN348のBsrGI / SpeI部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドにpTip-QT1、pTip-QC1と名前を付けた。pTip-RT2から0.3 kbのTipA遺伝子プロモーター、LG10-RBS、MCS type 2を含む断片をBsrGIとSpeIで切り出し、pHN171とpHN348のBsrGI / SpeI部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドにpTip-QT2、pTip-QC2と名前を付けた。

#### 【0112】

図18-1にpTipベクター (pTip-QT1、pTip-QT2、pTip-RT1、pTip-RT2、pTip-QC1、pTip-QC2、pTip-RC1、pTip-RC2) のマップを示す。該図中、Thiorはチオストレプトン耐性遺伝子を、TuflpはTufl遺伝子プロモーターを、Tetrはテトラサイクリン耐性遺伝子を、Chlrはクロラムフェニコール耐性遺伝子を (各pTip-ベクターはTuflp-TetrまたはChlrいずれか一つを持つ)、ALDHpはTipA遺伝子 (TipA) を転写せしめるThcAプロモーターを、Amprはアンピシリン耐性遺伝子を、ColE1は大腸菌の複製起点を、ALDHt はThcA遺伝子転写終結配列を、MCSはマルチクローニング部位を (各pTip-ベクターはMCS type1またはMCS type 2のいずれか一つを持つ)、TipApはTipA遺伝子プロモーターを、TipA-LG10pはTipA-LG10プロモーターを、RepA&BはpRE2895由来のプラスミドのR. erythropolis内での自律複製に必須な領域を、RepはpRE8424由来のプラスミドのR. erythropolis内での自律複製に必須な領域を (各pTip-ベクターはRepA&BまたはRepのいずれか一つを持つ) 示す。なお、実施例9に書かれたpNitベクター (後述) の図が該図、右半分に記してあり、記号などは上記のものと同じである。

### 【0113】

図20は、TipA-LG10プロモーター - MCS - ThcA遺伝子ターミネーターのDNA配列を示す。該図中、実線の矢印はTipA遺伝子プロモーター中に存在するInverted repeat配列を示す。斜線の矢印はThcA遺伝子転写終結配列に存在するInverted repeat配列を示す。また、原核生物のプロモーター領域に一般的に存在し、遺伝子の転写に重要な-10領域、-35領域は四角で囲んである。また、四角で囲まれたTATAAT配列はTipA遺伝子プロモーターからNitプロモーターを作成したときに導入した変異を示す (実施例7に詳述)。

### 【0114】

#### 〔実施例7〕

#### pHN231の構築

まず本発明者は、TipA遺伝子プロモーターに変異を導入して、誘導型から構成型プロモーターに改変することとした。TipA遺伝子プロモーター配列中の「Inverted repeat」領域にチオストレプトン - TipAタンパク質複合体が結合し、自らの遺伝子の転写を促進することは以前から知られていた (Holmes et al., EMBO

J. 12 3183-3191 [1993])。そこで、本発明者は該DNA領域に、inverted repeat 構造を破壊する変異を導入したら、TipA遺伝子プロモーターの転写活性に何らかの変化が現れるのではないかと考え、様々なTipA遺伝子プロモーター変異体を作成した。それらのうち、TipA遺伝子プロモーターの所謂-10領域 (Fenton and Gralla. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 9020-9025 [2001]) に変異を導入したもの (図 19 ; CAGCGT から TATAAT への変異) では、チオストレプトン非存在下でも、レポーター遺伝子の発現が観察された (図 20 ; 実施例 10 に詳述)。なお、このTATAATからなるDNA配列は、大腸菌において非常に強力なプロモーターとして機能するDNA配列中の-10領域によく見られる配列である。以上のことからこの変異TipA遺伝子プロモーターは構成型プロモーターであると結論された。また、この構成型プロモーターにNit (Non-Inducible TipA ; 図中ではNitpと表記) プロモーターと名前を付けた。

#### 【0115】

Nitプロモーターを構築した過程を以下に示す。pHN150u (参考例 1 を参照) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 75 (sHN217)、76 (sHN218) に記載のプライマーを用いてインバースPCRにてDNAの増幅を行った。なお、pHN150uは、p Bluescript II SK (+) のMCSに、野生型TipA遺伝子プロモーターがクローン化されたプラスミドで、また上記2つのプライマーはその5'末端がそれぞれリン酸化されている。このインバースPCR断片をリガーゼ反応により自己閉環化し、結果出来たプラスミドにpHN231と名前を付けた。pHN231はNitプロモーターがp Bluescript II SK (+) のMCSにクローン化された形になっている。

#### 【0116】

##### 〔実施例 8〕

PIPをレポーター遺伝子として有する構成型発現ベクターの構築 ; pHN407、pHN385、pHN409、pHN389の構築

pTip-NH1 (参考例 1 を参照) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 77 (sHN395)、78 (sHN396) に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた1.6 kbの断片はテトラサイクリン耐性遺伝子を含む。この断片をHpaIとKpnIで消化し、pHN379 (実施例 5) のHpaI / KpnI部位に導入した。こ

の結果出来たプラスミドにpHN381と名前を付けた。pHN346（実施例 4）をテンプレートとし、配列表中の配列番号 79（sHN397）、80（sHN398）に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた1.8 kbの断片はクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む。この断片をHpaIとKpnIで消化し、pHN380（実施例 5）のHpaI / KpnI部位に導入した。この結果出来たプラスミドにそれぞれpHN382と名前を付けた。pHN231（実施例 7）から0.2 kbのNitプロモーターを含む断片をBsrGIとNcoIで切り出し、pHN381とpHN382のBsrGI / NcoI部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドにpHN383、pHN387とそれぞれ名前を付けた。pHN231（実施例 7）をテンプレートとし、配列表中の配列番号 81（sHN147）、82（sHN376）に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた0.2 kbの断片はNitプロモーターのうちRBS部分は含んでいない。この断片をBsrGIとXbaIで消化し、pHN381とpHN382のBsrGI / XbaI部位にそれぞれ導入した。この結果出来たプラスミドにpHN385、pHN389とそれぞれ名前を付けた。また、このNitプロモーター（RBS部分除く） - LG10RBSのハイブリッドDNAをNit-LG10プロモーターとする。pHN171をテンプレートとし、配列表中の配列番号 83（sHN388）、84（sHN120）に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた1.9 kbの断片はpRE2895由来のRepABオペロンを含む。この断片をBsrGIとHpaIで消化し、pHN387とpHN389のBsrGI / HpaI部位にそれぞれ導入した。この結果出来たプラスミドにpHN407、pHN409とそれぞれ名前を付けた。

#### 【0117】

またコントロール実験用プラスミドとして、pHN387から、0.2 kbのNitプロモーターをBsrGIとNcoIで切り出した。このDNA断片をpHN380（実施例 5）のBsrGI / NcoI部位に導入した。この結果できたプラスミドにpHN410と名前を付けた。

#### 【0118】

##### 〔実施例 9〕

##### pNitベクターの構築

pHN407、pHN385、pHN409、pHN389（実施例 8）のPIP遺伝子の代わりに、MCSを導入し、8種類のpNitベクターを構築した過程を示す。

#### 【0119】

pTip-RT1 (実施例 6) から 2.2 kb の断片を NcoI と KpnI で切り出し、pHN407、pHN385、pHN409、pHN389 の NcoI / KpnI 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pNit-QT1、pNit-RT1、pNit-QC1、pNit-RC1 とそれぞれ名前を付けた。pHN385 (実施例 8) をテンプレートとし、配列表中の配列番号 81 (sHN147)、85 (sHN160) に記載のプライマーを用いて、PCR による DNA の増幅を行った。得られた 0.2 kb の断片は Nit-LG10 プロモーターを含む。この断片を BsrGI と NdeI で消化した。一方、pTip-RT2 (実施例 6) から、2.0 kb の MCS type 2、アンピシリン耐性遺伝子、ColE1 を含む断片を NdeI と KpnI で切り出した。上記 2 つの DNA 断片を同時に、pHN407、pHN385、pHN409、pHN389 (実施例 8) の BsrGI / KpnI 部位にそれぞれ導入した。この結果できたプラスミドに pNit-QT2、pNit-RT2、pNit-QC2、pNit-RC2 とそれぞれ名前を付けた。

#### 【0120】

図 18-2 に pNit ベクター (pNit-QT1、pNit-QT2、pNit-RT1、pNit-RT2、pNit-QC1、pNit-QC2、pNit-RC1、pNit-RC2) のマップを示す。略号等は実施例 6 に記された通りである。

#### 【0121】

##### 〔実施例 10〕

TipA 遺伝子プロモーター、Nit プロモーターからの PIP の発現

pHN380、pHN410、pHN381、pHN387、pHN389 を用いて、pTip、pNit ベクター群からの遺伝子発現様式を観察した。以下に、その過程と結果を示す。

#### 【0122】

まず、R. erythropolis JCM3201 株を pHN380、pHN410、pHN381、pHN387、pHN389 で、形質転換した。これら形質転換体を用いて PIP のペプチダーゼ活性を測定した。結果を図 20 に示す。

#### 【0123】

図 20 中、形質転換に用いたプラスミドの名前とそれぞれの簡単な特徴が示されており、黒いバーはチオストレプトンで該形質転換体进行处理したとき、網掛けのバーはチオストレプトンで該形質転換体进行处理しなかったときの PIP のペプチダーゼ活性を示す。pHN380 (TipA-LG10 プロモーター - PIP からなる遺伝子カセッ

トをpTipベクターの骨格に持つ)での形質転換体はチオストレプトンによる遺伝子発現制御が働いているが、pHN410 (Nitプロモーター - PIPからなる遺伝子カセットをpTipベクターの骨格中に持つ)での形質転換体はチオストレプトンによる遺伝子発現制御が働いていない。また、pHN387はpHN410からチオストレプトン耐性遺伝子と、ThcA遺伝子プロモーター - TipA遺伝子からなる遺伝子カセットを取り除いた形のプラスミドであるが、このプラスミドでの形質転換体もチオストレプトンがなくても、PIPが発現していた。つまり、TipAタンパク質がなくても、Nitプロモーターからの遺伝子発現がおこることを意味する。pHN387、pHN389による形質転換体を用いた結果から、RBSの配列はチオストレプトンによる遺伝子発現制御には関係ないことが示唆された。pHN381はpHN389のNit-LG10プロモーターをTipA-LG10プロモーターに置換したものであるが、pHN381での形質転換体ではPIPの発現は構成的になっていない。以上のことから、Nitプロモーター、Nit-LG10プロモーターが構成型のプロモーターで、その発現にTipAタンパク質を必要としないことがわかる。

#### 【0124】

なお、pTip、pNitベクターからのPIPの発現は30℃ばかりでなく、4℃でも可能であったことを確認した。

#### 【0125】

##### 〔実施例11〕

pRE2585、pRE8424由来プラスミドの自律複製に必須な領域の比較

pTipベクターとpNitベクター群を用いて、pRE2585、pRE8424由来プラスミドの自律複製に必須な領域の特徴を調べた。

#### 【0126】

まず、pNit-QC2とpNit-RC2のR. erythropolis JCM 3201, R. fascians JCM10002, R. opacus DSM44193, R. ruber JCM3205 and R. rhodochrous JCM3202に対する形質転換効率を調べた。結果を表3に示す。表3では各1  $\mu$ gのプラスミドDNAを用いて形質転換した時に、クロラムフェニコールを含む固体培地上に出現したコロニー数を示す。この結果から、R. erythropolis JCM 3201, R. fascians JCM10002, R. opacus DSM44193では、効率の差はあるものの、pNit-QC2とpNit-R



C2、いずれでも形質転換が可能であることがわかった。なお、R. ruber JCM3205、R. rhodochrous JCM3202では形質転換体は得られなかった。

#### 【0127】

次にpHN409とpHN389（実施例9）でR. erythropolis JCM 3201、R. fascians JCM10002、R. opacus DSM44193を形質転換した。なお、pHN409とpHN389の違いは自律複製に必須な領域がpRE2585に由来するかpRE8424に由来するか、だけである。R. erythropolis JCM3201において、pHN409で形質転換した細胞と、pHN389で形質転換した細胞とで、PIPペプチダーゼ活性を比較したところ、ほとんど差がないか、若干pHN409で形質転換した細胞の方が高かった。この結果は、R. fascians JCM10002、R. opacus DSM44193を宿主とした場合でもほぼ同様であった。また、R. erythropolis JCM3201でのPIPペプチダーゼ活性よりもR. fascians JCM10002、R. opacus DSM44193でのPIPペプチダーゼ活性の方がいずれのプラスミドを用いた場合でも低かった。

#### 【0128】

次にpNit-QC2とpNit-RC2のR. erythropolis JCM 3201細胞内でのプラスミドコピー数を調べた。実験手法はProjanらの方法（Projan et al., Plasmid 9 182-190 [1983]）に従った。この方法でプラスミドコピー数を計算するためにはR. erythropolis JCM 3201のゲノムサイズを知る必要があるが、van der Geizeらによれば、R. erythropolis ATCC4277株から派生した株、R. erythropolis RG1株のゲノムサイズが6メガベースペア（Mbp）であり、かつ、R. erythropolis ATCC 4277株とR. erythropolis JCM 3201株がほぼ同等の菌株であることから、R. erythropolis JCM 3201株のゲノムサイズも6 Mbpとして計算した。結果は、pNit-QC2が、 $47 \pm 5$ 、pNit-RC2が、 $64 \pm 5$ のコピー数であった。

#### 【0129】

##### 〔実施例12〕

##### プラスミド不和合性

細菌では一般に、同一の複製起点を持つ異種プラスミドは細胞内に共存できないことが多い。これはプラスミド不和合性（plasmid incompatibility）と呼ばれる現象によるもので（Novick, Microbiol. Rev. 51 381-395 [1987]）、Rhodo

coccus属細菌と近縁のMycobacterium属でも報告されている (Stolt and Stoker, Microbiology 142 2795-2802 [1996])。本発明者は、配列の異なる2つのR. erythropolis内在性プラスミドを分離したことから (pRE2895とpRE8424)、複数のプラスミドを単一細胞内に共存させ、組換えタンパク質生産に利用できると考えた。そこで、まず、pTip-、pNit-ベクター群のプラスミド不和合性について調べた。

### 【0130】

R. erythropolis JCM 3201に対して、pNit-QC2またはpNit-RC2で第一の形質転換を行い、さらに、これらの形質転換体細胞に対してpNit-QT2またはpNit-RT2で第二の形質転換を行った。第二の形質転換後は、テトラサイクリンのみを含むLB固体培地で形質転換体を選択した。結果を表4に示す。表4中、右から二番目のカラムは、各1  $\mu$ gのプラスミドDNAを用いて第二の形質転換した時に、テトラサイクリンを含む固体培地上に出現したコロニー数を示す。一番右のカラムは、第二の形質転換後に、第一の形質転換に用いたプラスミドが残っていたコロニーの確率(%)、即ち、第二の形質転換後にテトラサイクリン耐性だったコロニーの出現率を示す。その際、調べたコロニー数は各20コロニー ( $n = 20$ ) である。表4に示されたように、同じ複製起点を持つ2つのプラスミドを用いた場合、第二の形質転換効率が極端に低下したこと、第二の形質転換後に第一の形質転換プラスミドが高頻度に消失していることから、不和合性を引き起こしたといえる。それに対して、別種の複製起点を持つ2つのプラスミドでは、第二の形質転換効率が低下しなかったこと、第二の形質転換後にも第一の形質転換プラスミドが安定に存在していることから不和合性を起こさなかったことが示唆された。つまり、pRE2585から派生したプラスミドと、pRE8424から派生したプラスミドは完全に「compatible」であるといえる。

### 【0131】

#### 〔実施例13〕

組換えタンパク質の単一細胞内での共発現

実施例12に書かれたようにpRE2585から派生したプラスミドと、pRE8424から派生したプラスミドは完全にcompatibleで、一つのR. erythropolis細胞内に共

存可能であった。このことを利用して、PIPとGFPの単一細胞内での共発現を試みた。

### 【0132】

まず、pHN187 (参考例1を参照) をテンプレートとし、配列表中の配列番号86 (sHN337)、87 (sHN338) に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた0.2 kbの断片はGFP遺伝子の5'末端側を含む。この断片をNcoIで消化し、この断片の5'末端をリン酸化した。一方、pHN187をテンプレートとし、配列表中の配列番号88 (sHN339)、89 (sHN340) に記載のプライマーを用いて、PCRによるDNAの増幅を行った。得られた0.5 kbの断片はGFP遺伝子の3'末端側を含む。この断片をBglIIで消化し、その5'末端をリン酸化した。これら2つのDNA断片を同時にpNit-QT1とpNit-RT1のNcoI / BglII部位にそれぞれ導入し、できたプラスミドにそれぞれpHN425、pHN426と名前を付けた。pHN425、pHN426は全長のGFP遺伝子含み、GFPのC末端側に6×Hisタグが付加されるような配列が融合されている。また、GFP遺伝子内部に存在していたNcoI部位は上記作業中に除かれているが、GFPの機能に変化はない。

### 【0133】

pHN425とpHN389で、*R. erythropolis* JCM3201を共形質転換し、形質転換体をテトラサイクリンとクロラムフェニコール両方を含む培地で選択した。また、pHN426とpHN409で、*R. erythropolis* JCM3201を形質転換し、共形質転換体をテトラサイクリンとクロラムフェニコール両方を含む培地で選択した。また、対照実験として、pHN425、pHN426、pHN389、pHN409で*R. erythropolis* JCM3201をそれぞれ形質転換した。これら6種類の形質転換体を実施例1に記載されたようにしてPIPとGFPを発現させ、ニッケルイオンを用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製した。組換えタンパク質の精製、精製前並びに精製後のサンプルのSDSポリアクリルアミド電気泳動は以下の方法で行った。PIPのC末端には6×Hisタグがついており、Ni-NTA Superflow (Qiagen社製) を用いて、その使用説明書に準じて精製を行った。

### 【0134】

以下に具体的な精製法を示すが、精製の作業は4℃で行った。タンパク質を発

現させた菌体 (20 ml培養液分) を回収し、1 mlのNT-Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM塩化ナトリウム、1 mMジチオスレイトール) に懸濁し、1 gのガラスビーズ (直径0.105-0.125ミリメートル) を加えた。これをFast-prep F P120 (SAVANT社製) にて6 m/秒の速度、20秒間往復振とう運動させることで、細胞を破壊した。20,000×gにて遠心し、その上清700  $\mu$ lに、予めNT-Bufferで平衡化されたNi-NTA Superflowをベッド体積40  $\mu$ lになるように加えた。これを1時間回転撹拌しながらNi-NTA Superflowビーズと6×Hisタグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズをNT-Bufferで4回洗浄した後、120  $\mu$ lのNTE-Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、100 mM塩化ナトリウム、1 mMジチオスレイトール、400 mMイミダゾール) に3回懸濁することで、ビーズから6×Hisタグのついたタンパク質を溶出させた。上記サンプルのうち10  $\mu$ lを常法に従い、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動に供した。SDSポリアクリルアミド電気泳動結果後、ゲルをクマシーブリリアントグリーンG-250で染色した結果を図21に示した。

#### 【0135】

図21中、奇数番号のレーンは細胞の粗抽出液 (即ち、精製前のサンプル)、偶数番号のレーンは金属キレートクロマトグラフィーで精製した後のサンプルを示す。また、レーン1, 2はpHN425とpHN389で共形質転換した*R. erythropolis* JC M3201からのサンプル、レーン3, 4はpHN426とpHN409で共形質転換した細胞からのサンプル、レーン5, 6はpHN425で形質転換した細胞からのサンプル、レーン7, 8はpHN426で形質転換した細胞からのサンプル、レーン9, 10はpHN389で形質転換した細胞からのサンプル、レーン11, 12はpHN409で形質転換した細胞からのサンプルである。

#### 【0136】

図21のレーン2と4に2本のバンドが見られることから、PIP、GFPが、単一の細胞内で共発現され、精製されたことが示された。また、共発現させたとき (レーン2, 4) と、それぞれ単独で発現させたとき (レーン6, 8, 10, 12) のPIP、GFPの発現量に大きな差異は見られなかった。

#### 【0137】

表1に実施例で用いた各プラスミドのリストを、表2に実施例で用いた菌株のリストを、表3にpNit-QC2とpNit-RC2のR. erythropolis JCM 3201, R. fascians JCM10002, R. opacus DSM44193に対する形質転換効率を、表4にpNit-QC2、pNit-RC2、pNit-QT2、pNit-RT2によるR. erythropolis JCM 3201への共形質転換の結果を示す。

【0138】

【表 1】

本発明に用いた主なプラスミド

| 分類  | プラスミド名   | 備考   | ソース            |
|---|----------|--|----------------|
| Cryptic plasmids of <i>R. erythropolis</i>              | pRE2895  | Source of <i>RepAB</i> (cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM2895)          | 特願 2002-235008 |
|   | pRE8424  | Source of <i>Rep</i> (cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> DSM8424)            | This study     |
|   | PRE2893  | Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM2893                                   | This study     |
|   | PRE2894  | Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM2894                                   | This study     |
|   | PRE43200 | Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> DSM43200                                  | This study     |
| For identification of DSO and SSO of pRE8424            | pHN267   | <i>KarI</i> on pGEM 3Zf(+)   | This study     |
|   | pHN317   | <i>Rep</i> , DSO, IR I, IR II (SSO) on pHN267  | This study     |
|   | pHN345   | <i>Rep</i> , DSO, mutated IR I, IR II (SSO) on pHN267  | This study     |
|   | pHN362   | <i>Rep</i> , DSO, IR I, mutated IR II on pHN267  | This study     |
|   | pHN363   | <i>Rep</i> , DSO, mutated IR I, mutated IR II on pHN267  | This study     |
|   | pHN322   | <i>Rep</i> , DSO, IR I, IR II (SSO) on pHN267  | This study     |
|   | pHN343   | <i>Rep</i> , DSO, IR II (SSO) on pHN267  | This study     |
|   | pHN344   | <i>Rep</i> , DSO, IR I, IR II (SSO) on pHN267  | This study     |
|   | pHN324   | <i>Rep</i> , IR I, IR II (SSO) on pHN267   | This study     |
| Source of <i>Rep</i> region for pTip- and pNit- vectors | pHN372   | 2.0-kb region originating from pRE8424 on pBluescript SK (+), <i>Bam</i> HI site is eliminated | This study     |
| pTip-vectors  | pTip-QT1 | <i>P<sub>TipA'</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 1         | This study     |
|   | pTip-QT2 | <i>P<sub>TipA'</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 2         | This study     |
|   | pTip-RT1 | <i>P<sub>TipA'</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Rep</i> (pRE8424), MCS type 1           | This study     |
|   | pTip-RT2 | <i>P<sub>TipA'</sub></i> , <i>Tet<sup>r</sup></i> , <i>Rep</i> (pRE8424), MCS type 2           | This study     |
|   | pTip-QC1 | <i>P<sub>TipA'</sub></i> , <i>Chl<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 1         | This study     |
|   | pTip-QC2 | <i>P<sub>TipA'</sub></i> , <i>Chl<sup>r</sup></i> , <i>RepAB</i> (pRE2895), MCS type 2         | This study     |

|                           |          |   |                |
|---------------------------|----------|---|----------------|
|                           | pTip-RC1 | $P_{TipA}$ , $Chf^+$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 1  | This study     |
|                           | pTip-RC2 | $P_{TipA}$ , $Chf^+$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 2  | This study     |
| <hr/>                     |          |   |                |
| pNit-vectors              | pNit-QT1 | $P_{Nit}$ $Tet^r$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 1   | This study     |
|                           | pNit-QT2 | $P_{Nit}$ $Tet^r$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 2   | This study     |
|                           | pNit-RT1 | $P_{Nit}$ $Tet^r$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 1   | This study     |
|                           | pNit-RT2 | $P_{Nit}$ $Tet^r$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 2   | This study     |
|                           | pNit-QC1 | $P_{Nit}$ $Chf^+$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 1   | This study     |
|                           | pNit-QC2 | $P_{Nit}$ $Chf^+$ , $RepAB$ (pRE2895), MCS type 2   | This study     |
|                           | pNit-RC1 | $P_{Nit}$ $Chf^+$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 1   | This study     |
|                           | pNit-RC2 | $P_{Nit}$ $Chf^+$ , $Rep$ (pRE8424), MCS type 2   | This study     |
| <hr/>                     |          |   |                |
| PIP expression<br>vectors | pHN171   | 6xHis-PIP in MCS of pTip-LCH1   | 特願 2002-235008 |
|                           | pHN379   | 6xHis-PIP in MCS of pTip-RT1  | This study     |
|                           | pHN348   | 6xHis-PIP in MCS of pTip-QC1  | This study     |
|                           | pHN380   | 6xHis-PIP in MCS of pTip-RC1  | This study     |
|                           | pHN407   | 6xHis-PIP in MCS of pNit-QT1  | This study     |
|                           | pHN385   | 6xHis-PIP in MCS of pNit-RT1  | This study     |
|                           | pHN409   | 6xHis-PIP in MCS of pNit-QC1  | This study     |
|                           | pHN389   | 6xHis-PIP in MCS of pNit-RC1  | This study     |
|                           | pHN410   | $P_{TipA}$ and LG10-RBS of pHN380 were substituted into<br>$P_{Nit}$ and wild-type TipA-RBS, respectively | This study     |
|                           | pHN387   | LG10-RBS of pHN389 was substituted into wild-type RBS<br>of TipA-RBS                                      | This study     |
|                           | pHN381   | $P_{Nit}$ of pHN389 was substituted into $P_{TipA}$   | This study     |
| <hr/>                     |          |   |                |
| GFP expression<br>vectors | pHN425   | 6xHis-GFP in MCS of pTip-QT1  | This study     |
|                           | pHN426   | 6xHis-GFP in MCS of pTip-RT1  | This study     |
| <hr/>                     |          |   |                |

【0139】

【表 2】

本発明に用いた主な菌株

| 属、種                             | 菌株       | ソース  | 適用  |
|---------------------------------|----------|--|---|
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | JCM2895  | Japan Collection of Microorganisms                       | Source of pRE2895                                 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | DSM8424  | German Collection of Microorganisms<br>and Cell Cultures | Source of pRE8424                                 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | JCM2893  | Japan Collection of Microorganisms                       | Source of pRE2893                                 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | JCM2894  | Japan Collection of Microorganisms                       | Source of pRE2894                                 |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | DSM43200 | German Collection of Microorganisms<br>and Cell Cultures | Source of pRE43200                                |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | JCM3201  | Japan Collection of Microorganisms                       | Host strain to express recombinant<br>proteins    |
| <i>Rhodococcus fascians</i>     | JCM10002 | Japan Collection of Microorganisms                       | Host strain to express recombinant<br>proteins    |
| <i>Rhodococcus opacus</i>       | DSM44193 | German Collection of Microorganisms<br>and Cell Cultures | Host strain to express recombinant<br>proteins    |
| <i>Rhodococcus ruber</i>        | JCM3205  | Japan Collection of Microorganisms                       | Host strain to express recombinant<br>proteins    |
| <i>Rhodococcus rhodochrous</i>  | JCM3202  | Japan Collection of Microorganisms                       | Host strain to express recombinant<br>Proteins    |
| <i>Streptomyces coelicolor</i>  | JCM4979  | Japan Collection of Microorganisms                       | Source of <i>dnak</i><br>transcription terminator |
| <i>Escherichia coli</i>         | DH5α     |  | General cloning                                   |
| <i>Escherichia coli</i>         | ER2508   | New England Biolabs                                      | Source of <i>Kan<sup>r</sup></i>                  |

【0140】



【表 3】

pNit-QC2 と pNit-RC2 の形質転換効率

| プラスミド    | 宿主細胞                   |                    |                   |
|----------|------------------------|--------------------|-------------------|
|          | <i>R. erythropolis</i> | <i>R. fascians</i> | <i>R. opacus</i>  |
| pNit-QC2 | $3.8 \times 10^5$      | $8.2 \times 10^2$  | $1.6 \times 10^4$ |
| pNit-RC2 | $2.8 \times 10^5$      | $4.0 \times 10^2$  | $5.2 \times 10^2$ |

【0141】

【表 4】

R.erythropolis JCM 3201 株におけるプラスミド不和合性

| 第一の形質転換に用いたプラスミド | 第二の形質転換に用いたプラスミド | 第二の形質転換の効率        | 第一の形質転換に用いたプラスミドが残っていたコロニーの率 (%; $n = 20$ ) |
|------------------|------------------|-------------------|---|
| なし               | pNit-QT2         | $3.2 \times 10^5$ | -   |
| pNit-QC2         | pNit-QT2         | $2.0 \times 10^3$ | 50  |
| pNit-RC2         | pNit-QT2         | $1.3 \times 10^5$ | 100   |
| なし               | pNit-RT2         | $4.4 \times 10^4$ | -   |
| pNit-QC2         | pNit-RT2         | $3.3 \times 10^4$ | 100   |
| pNit-RC2         | pNit-RT2         | $2.4 \times 10^2$ | 65  |

【0142】

【発明の効果】

本発明の新規なローリングサークル型の複製様式で複製し得るベクターであつて、Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を 4℃から 35℃の温度条件下で誘導物質により誘導発現しうる発現ベクターおよび外来遺伝子を誘導物質非依存的に構成的に発現し得るベクターを用いることにより、効率的にRhodococcus属細菌で外来タンパク質を産生させることができ、特に宿主微生物として低温でも増殖し得る微生物を用いることにより、通常の微生物の増殖に適した温度条件、即ち約15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質を発現産生させることが可能である。さらに、互いにプラスミド不和合性を起こさない少なくとも 2 種類のRhodococcus属細菌由来の発現プラスミドベクターであつて、少なくとも 2 種類のプラスミドが、プラスミドの自律複製に必要な DNA 配列として、それぞれローリングサークル型複製様式をもつ DNA 配列と、pRE258 由来のプラスミドの自律複製に必要な DNA 配列を有するベクターは不和合性の問題を起こすことなく、同一の微生物細胞中で安定に維持され、それぞれのベクターが含む外来遺伝子がコードするタンパク質を同一の微生物細胞中で共発現させることが可能である。

【0143】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Advanced Industrial Science and Technology

<120> A method for producing a recombinant protein by using a single or plural vectors in a bacterium belonging to genus Rhodococcus

<130> 341H03001

<140>

<141>

<160> 107

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN1

<400> 1

cagagctcgt caggtggcac ttttc

25

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN2

<400> 2

gttgataaac tagtcgtgcc agctgcatta

30

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN120

<400> 3

gctgtacacc cgagaagctc ccagcg

26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN121

<400> 4

cggagctctt gaacgagagt tggccgttg

29

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN122

<400> 5

tcagatctat cgtcacgcac tgcgatcacg ttgacgccg

39

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN123

<400> 6

acggatcctc cgctgaaatc tcgccgtgcc t

31

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN130

<400> 7

cttcatatgc ggagctcgac cgcgcggg

28

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN131

<400> 8

atcgagtcgt tcaagggcgt cggc

24

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1233

<400> 9

agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN10

..

<400> 10

caccaggatg atccccgac

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN11

<400> 11

gacagtgaca tcaccagc

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1224

<400> 12

cgccagggtt ttcccagtca cgac

24

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer sHN40

&lt;400&gt; 13

atgagctact ccgtgggaca ggtg

24

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer sHN41

&lt;400&gt; 14

tgcagatctt ccgtttcgac gtgacggag

29

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 26



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN42

<400> 15

cagtctagaa ttgatctcct cgaccg

26

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN43

<400> 16

tgcaagctcc tatgtaaagc

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN55

<400> 17

cgcctgctcc acggccgcc

19

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN56

<400> 18

atggaggcac gcagcatg

18

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN57

<400> 19

cgccccctcg gagtcggcg

19

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN58

<400> 20

atggacgccg ccgaggac

18

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN147

<400> 21

cgtgtacata tcgaggcggg ctccca

26

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN39

<400> 22

atccatggcc gctcccttct ctgacgccgt c

31

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN36

<400> 23

accatggatc aggaatgcat ag

22

<210> 24

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN37

<400> 24

ttactagttt attaatgatg atgatgatga tgcaggtgtt tcaggatgaa atccgaaag 59

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN6

<400> 25

cgtctagagt cccgctgagg cggcgtagc

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN9

<400> 26

ctactagtcg acccaccggc acccgtgag

29

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN141

<400> 27

aatctagagt aacgggctac tccgtttaac

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN142

<400> 28

gggtcgacgg tcctcctgtg gagtggttct

30

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN145

&lt;400&gt; 29

gcactcgaga tgaaatctaa caatgcgctc atc

33

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer sHN152

&lt;400&gt; 30

agactagtcc tcaacgacag gagcacgac

30

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer T7

&lt;400&gt; 31

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN153

<400> 32

aatccacagg acgggtgtgg

20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN154

<400> 33

ctctacgccg gacgcatcg

19

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T3

<400> 34

gcaattaacc ctcactaaag gg

22

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN155

<400> 35

acgacgctct cccttatgcg

20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN156

<400> 36

ccgatgccct tgagagcct

19

<210> 37

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN110

<400> 37

aaccatggta tatctccttc ttaaagttaa acaaaattat ttctagacgc cgtccacgct 60  
gcctcct 67

<210> 38

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNcol

<400> 38

catgggccac catcaccatc accatatggg aattctacgt agcggccgcg gatccaagct 60  
tagatctcga ggatgaa 77

<210> 39

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco2

<400> 39

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatatgg 60  
tgatgggtgat ggtggcc 77

<210> 40

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco1

<400> 40

catgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60  
ccatcactga a 71

<210> 41

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco2

<400> 41

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60  
cgtagaattc c 71

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN159

<400> 42

tccatatgcg ctcccttctc tgacgccgt 29

<210> 43

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNdel

&lt;400&gt; 43

tatgggccat caccatcacc atcacgccat gggaattcta cgtacgggcc gcggatccaa 60  
gcttagatct cgaggatgaa 80

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 82

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer NNde2

&lt;400&gt; 44

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatggcg 60  
tgatggtgat ggtgatggcc ca 82

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer CNdel

&lt;400&gt; 45

tatgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60  
ccatcactga a 71

<210> 46

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde2

<400> 46

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60  
cgtagaattc cca 73

<210> 47

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN160

<400> 47

aacatatgta tatctccttc ttaaagttaa ac 32

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN343

<400> 48

aaactagttc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc t

41

<210> 49

<211> 8166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH1

<400> 49

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttcatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600

gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgagc cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcgccc aaccgataag cgctctgtt cctcggacgc tcggttctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggtactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcaccggtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacggat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaacc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcttggtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcattggcg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttc ggcggcatcg ggatgccgcg 2280  
gttcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340



gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgta 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcagggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatcttctt aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080

tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc 4320  
taaccatgag tgataacact gggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcagg 4620  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcg ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatgggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgtgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt tttctgctg gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttctg gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcggt gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820

ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgctgtttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gtcacgggt gccgggtgggt 6000  
cgactagttc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060  
tggtgatggg gatgggtggc catggccgct cccttctctg acgccgtcca cgctgcctcc 6120  
tcacgtgacg tgaggtgcaa gcccggacgt tccgcgtgcc acgccgtgag ccgccgcgtg 6180  
ccgtcggctc cctcagcccg ggccggccgtg ggagcccgcc tcgatatgta caccgagaa 6240  
gtcccagcg tctcctggg ccgcgatact cgaccaccac gcacgcacac cgactaacg 6300  
attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccggcg 6360  
ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccga gcagaagagt gaacaaccac cgaccacgt 6420  
tccgctctgc gcgccgtacc cgacctact cccgcagctc gaagcagctc ccgggagtag 6480  
cgccgtactc acccgctgt gtcaccatc caccgacga aagcccaacc cgagcacacc 6540  
tcttgacca aggtgccgac cgtggctttc cgctcgcagg gticcagaag aaatcgaacg 6600  
atccagcgcg gcaaggttca aaaagcaggg gttggtgggg aggaggtttt ggggggtgtc 6660  
gccgggatac ctgatatggc tttgttttgc gtagtcgaat aattttccat atagcctcgg 6720  
cgctcggac tcgaatagtt gatgtggcg ggcacagttg ccccatgaaa tccgaacgg 6780  
ggggcggtgt gagcgatcgg caatggcgcg atgcggtgtt gttccgcac cggccgttcg 6840  
cgacgaacaa cctccaacga ggtcagtacc ggatgagccg cgacgacga ttggcaatgc 6900  
ggtacgtcga gcattaccg cacgcgttgc tcggatctat cgtcatcgac tgcgatcag 6960  
ttgacgccgc gatgcgcga ttcgagcaac catccgacca tccggcgccg aactgggtcg 7020  
cacaatcgcc gtccggccgc gcacacatcg gatggtggct cggccccaac cacgtgtgcc 7080  
gcaccgacag cggccgactg acgccactgc gctacgcca ccgcatcgaa accggcctca 7140  
agatcagcgt cggcggcgat ttcgcgtatg gcgggcaact gacaaaaaac ccgattcacc 7200  
ccgattggga gacgatctac ggcccgcca cccgtacac attgcggcag ctggccacca 7260  
tccacacacc ccggcagatg ccgcgtcggc ccgatcgggc cgtgggcctg ggccgcaacg 7320  
tcaccatgtt cgacgccacc cggcgatggg catacccgca gtggtggcaa caccgaaacg 7380  
gaaccggccg cgactgggac catctcgtcc tgcagcactg ccacgccgc aacaccgagt 7440  
tcacgacacc actgccgttc accgaagtac gcgccaccgc gcaatccatc tccaaatgga 7500  
tctggcgcaa tttcaccgaa gaacagtacc gagcccgaca agcgcattc ggtcaaaaag 7560

gcggcaaggc aacgacactc gccaaacaag aagccgtccg aaacaatgca agaaagtacg 7620  
acgaacatac gatgcgagag gcgattatct gatgggcgga gccaaaaatc cgggtgcgccg 7680  
aaagatgacg gcagcagcag cagccgaaaa attcggtgcc tccactcgca caatccaacg 7740  
cttgtttgct gagccgcgtg acgattacct cggccgtgcg aaagctcgcc gtgacaaagc 7800  
tgtcgagctg cggaagcagg ggttgaagta ccgggaaatc gccgaagcga tggaactctc 7860  
gaccgggatc gtcggccgat tactgcacga cggccgcagg cacggcgaga tttcagcgga 7920  
ggatctgtcg gcgtaaccaa gtcagcgggt tgtcgggttc cggccggcgc tcggcactcg 7980  
gaccggccgg cggtatggtgt tctgcctctg gcgcagcgtc agctaccgcc gaaggcctgt 8040  
catcgaccgg cttcgactga agtatgagca acgtcacagc ctgtgattgg atgatccgct 8100  
cacgctcgac cgctacctgt tcagctgccg cccgctgggc atgagcaacg gccaaactctc 8160  
gttcaa 8166

<210> 50

<211> 8169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH2

<400> 50

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420

caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcacgcgcc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgctcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtctttctcc tttccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcaccggtt ctccggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cggccagtcc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtggt ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgtatgatcg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tctactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160

cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgacgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgctgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggaggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgcccca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900

gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaa 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagtig caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg 4620  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg tgggtctcg ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatgggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccattca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttctg gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640

tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcatatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtcctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccatg 6060  
gcgtgatggt gatggtgatg gcccatatgc gtccttct ctgacgccgt ccacgtgcc 6120  
tcctcacgtg acgtgagggt caagcccga cgttcgcgt gccacgccgt gagccgccgc 6180  
gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc gcctcgatat gtacaccga 6240  
gaagctcca gcgtcctcct gggccgcgat actcgaccac cagcacgca caccgacta 6300  
acgattcggc cggcgctcga ttccggccggc gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg 6360  
gcgtcgtatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag agtgaacaac caccgaccac 6420  
gcttcgcgc tgcgcgccgt acccgacct cctccgcag ctcgaagcag ctccgggag 6480  
taccgccga ctcaccgcc tgtgtcacc atccaccgac gcaaagcca acccgagcac 6540  
acctcttgca ccaagtgcc gaccgtggct ttccgctgc agggttccag aagaaatcga 6600  
acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg gggaggagggt tttggggggt 6660  
gtcgccggga tacctgatat ggctttgttt tgcgtagtcg aataattttc catatagcct 6720  
cggcgcgctc gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag ttgccccatg aaatccgcaa 6780  
cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcgt gttgcttcg caccggccgt 6840  
tcgcgacgaa caacctcaa cgaggtcagt accgatgag ccgcgacgac gcattggcaa 6900  
tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcggatc tatcgtcatc gactgcgac 6960  
acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aaccatccga ccatccggcg ccgaactggg 7020  
tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatggtg gctcggcccc aaccacgtgt 7080  
gccgcaccga cagcggccga ctgacgccac tgcgtacgc ccaccgcatc gaaaccggcc 7140  
tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgcgt atggcgggca actgacaaa aaccgattc 7200  
accccgattg ggagacgac tacggcccgg ccaccccgta cacattgcgg cagctggcca 7260  
ccatccacac acccggcgag atgccgcgtc ggcccgatcg ggccgtgggc ctgggccgca 7320  
acgtcacat gttcgacgcc accggcgat gggcataccc gcagtgggtg caacaccgaa 7380



acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca ctgccacgcc gtcaacaccg 7440  
agttcacgac accactgccg ttcaccgaag tacgcgccac cgcgcaatcc atctccaaat 7500  
ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg acaagcgcgcat ctcgggtcaaa 7560  
aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcccaaac aagaagccgt ccgaaacaat gcaagaaagt 7620  
acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc ggagccaaaa atccggtgcg 7680  
ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggg gcctccactc gcacaatcca 7740  
acgcttgttt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt gcgaaagctc gccgtgacaa 7800  
agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa atcgccgaag cgatggaact 7860  
ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacgccgcg aggcacggcg agatttcagc 7920  
ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg gggtgtcggg ttccggccgg cgctcggcac 7980  
tcggaccggc cggcggtatg tgttctgcct ctggcgcagc gtcagctacc gccgaaggcc 8040  
tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac agcctgtgat tggatgatcc 8100  
gtcacgctc gaccgctacc tgttcagctg ccgcccgctg ggcatgagca acggccaact 8160  
ctcgttcaa 8169

<210> 51

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-CH1

<400> 51

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240

gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300  
cgcgccggg gtggagtcca tcgaggctca cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggg 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggc cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcggggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttcgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgtg cagcagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca caggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggtactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcaccggtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgccagtc tgcctcgttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaacct 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980

ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactgggtcc cgccacaaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttcgaggcc atgtgtgcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3720

gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ctttctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcgggtgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgatitaa aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag acccctaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccattca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttctg gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460

ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgcggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatgggt atgggtatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggc cgctcccttc tctgacgccg tccacgtgc ctctcacgt 6120  
gacgtgaggt gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180  
gctccctcag cccggggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacaccg agaagctccc 6240  
agcgtcctcc tgggccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgact aacgattcgg 6300  
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6360  
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccacca cgcttccgct 6420  
ctgcgcgccg tacccgacct acctcccgca gctcgaagca gctcccggga gtaccgccgt 6480  
actacccgc ctgtgtcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540  
accaaggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600  
cgcggaagg ttcaaaaagc aggggttggg ggggaggagg ttttgggggg tgctgccggg 6660  
atacctgata tggtttgtt ttgcgtagtc gaataatitt ccatatagcc tcggcgcgtc 6720  
ggactcgaat agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780  
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840  
acaacctcca acgaggtcag tacgggatga gccgcgacga cgatttgca atgcggtacg 6900  
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcgat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg 6960  
ccgcgatgcg cgattcag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020  
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggatggg ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080  
acagcggccg actgacgcca ctgcgtacg ccaccgcat cgaaaccggc ctcaagatca 7140  
gcgtcggcgg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaaccgatt caccgccatt 7200

gggagacgat ctacggcccg gccaccccggt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260  
caccgccgca gatgccgctg cggcccgatc gggccgtggg cctgggcccgc aacgtcacca 7320  
tgttcgacgc caccggcgga tgggcatacc cgcagtggtg gcaacaccga aacggaaccg 7380  
gccgcgactg ggaccatctc gtcttcgacg actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440  
caccactgcc gttcacggaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc 7500  
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcggtcaa aaaggcggca 7560  
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620  
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680  
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttggt 7740  
tgctgagccg cgtgacgatt acctcggccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800  
gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860  
gatcgtcggc cgattactgc acgacgcccg caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920  
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcggca ctcggaccgg 7980  
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgagc cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040  
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgacg cgctcacgct 8100  
cgaccgctac ctgttcagct gccgcccgtg gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<210> 52

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-CH2

<400> 52

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120

tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccca tgcacagcat 300  
cgcgcccggt gtggagtcca tcgaggctca cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttcgc ctccgtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatcgcag gtcaacggtc 1080  
gtggtcgggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccgccacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cgtactgcc ggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgccagtc tgcctcctc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttccgggtca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccctctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860

cctaatagcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccc ttatgattct tctcgcttcc ggcggcacgc ggatgcccgc 2280  
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gcgcgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcacg 2700  
atcgctctcc tgcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggg gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc tccccgctc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccg 3120  
ccgcggaacc gcgcgcgcac ctgcgccgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtaac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600



agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactccccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatitttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ctttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccattca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340

acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgc ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
ggcgcggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcacc gcagcgaggg gtcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg cgctcccttc tctgacgccg tccacgtgc ctctcacgt 6120  
gacgtgaggt gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180  
gtccctcag cccgggcggc cgtgggagcc cgctcgata tgtacaccg agaagctccc 6240  
agcgtcctcc tgggcccga tactcgacca ccacgcacgc acaccgact aacgattcgg 6300  
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6360  
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420  
ctgcgcgccg taccgacct acctcccgca gtcgaagca gctcccggga gtaccgccgt 6480  
actacccgc ctgtgtcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540  
accaaggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600  
cgccgcaagg ttcaaaaagc aggggttggt ggggaggagg ttttgggggg tgtcgccggg 6660  
atacctgata tggctttgtt ttgcgtagtc gaataatitt ccatatagcc tcggcgcgtc 6720  
ggactcgaat agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780  
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840  
acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgatttggca atgcggtacg 6900  
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcgat ctatcgtcat cgactcgat cacgttgacg 6960  
ccgcgatgcg cgcatcag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020  
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggttgtt ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080

acagcgcccg actgacgcca ctgcgctacg cccaccgcat cgaaaccggc ctcaagatca 7140  
gcgtcggcgg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaacccgatt caccgccgatt 7200  
gggagacgat ctacggcccg gccaccccggt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260  
caccgccgca gatgccgctg cggcccgatc gggccgtggg cctgggcccgc aacgtcacca 7320  
tgttcgacgc caccggcgga tgggcatacc cgcagtgggt gcaacaccga aacggaaccg 7380  
gccgcgactg ggaccatctc gtcctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440  
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc 7500  
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcggtcaa aaaggcggca 7560  
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620  
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680  
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttggt 7740  
tgctgagccg cgtgacgatt acctcggccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800  
gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860  
gatcgtcggc cgattactgc acgacgcccg caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920  
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcggca ctcgaccgg 7980  
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgagc cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040  
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgacg cgctcacgct 8100  
cgaccgctac ctgttcagct gccgcccgtt gggcatgagc aacggccaac tctcggtcaa 8160

<210> 53

<211> 8189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LNH1

&lt;400&gt; 53

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccg cgtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccitca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccgt cgcgaggagg ccatcgccctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggttggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atccccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccaactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680

tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatagcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ctttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcattggcg cgcacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gcgcgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggg gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcgggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgtgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420

gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gtcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgtcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ctttctgtt tttgtcacc 4020  
cagaaacgtt ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctgggt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160

agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgc ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gtcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060  
tggtgatggt gatggtggcc catggtatat ctcttctta aagttaaaca aaattatttc 6120  
tagacgccgt ccacgtgcc tcctcacgtg acgtgagtg caagcccga cgttccgcgt 6180  
gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc 6240  
gcctcgatat gtacaccga gaagctcca gcgtcctcct gggcccgcat actcgaccac 6300  
cacgcacga caccgacta acgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg 6360  
gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag 6420  
agtgaacaac caccgaccac gttccgctc tcgcgcgccgt acccgacct cctcccgag 6480  
ctcgaagcag ctccgggag taccgccgta ctacccgcc tgtgctcacc atccaccgac 6540  
gcaaagccca acccgagcac acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc 6600  
agggttccag aagaaatcga acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg 6660  
gggaggagggt tttgggggggt gtcgccggga tacctgatat ggctttgttt tgcgtagtcg 6720  
aataattttc catatagcct cggcgcgctg gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag 6780  
ttgccccatg aaatccgcaa cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcggt 6840  
gttgcttccg caccggccgt tcgcgacgaa caacctcaa cgaggtcagt accggatgag 6900

ccgcgacgac gcattggcaa tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcggatc 6960  
tatcgtcatc gactgcgac acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aaccatccga 7020  
ccatccggcg ccgaactggg tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatgggtg 7080  
gctcggcccc aaccacgtgt gccgcaccga cagcgcccga ctgacgccac tgcgctacgc 7140  
ccaccgcacg gaaaccggcc tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgcgt atggcgggca 7200  
actgacaaa aaccgattc acccgattg ggagacgac tacggcccgg ccaccccgta 7260  
cacattgcgg cagctggcca ccatccacac acccggcag atgccgcgtc ggcccgatcg 7320  
ggccgtgggc ctgggcccga acgtcacat gttcgacgcc acccgcgat ggccataccc 7380  
gcagtgggtg caacaccgaa acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca 7440  
ctgccacgcc gtcaacaccg agttcacgac accactgccg ttcaccgaag tacgcgccac 7500  
cgcgcaatcc atctccaaat ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg 7560  
acaagcgcat ctcggtcaaa aaggcggcaa ggcaacgaca ctcgccaaac aagaagccgt 7620  
ccgaaacaat gcaagaaagt acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc 7680  
ggagccaaaa atccggtgcg ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcgggt 7740  
gcctccactc gcacaatcca acgcttggtt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt 7800  
gcgaaagctc gccgtgacaa agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa 7860  
atcgccgaag cgatggaact ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacgccgcg 7920  
aggcacggcg agatttcagc ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg ggttgctcggg 7980  
ttccggccgg cgctcggcac tcggaccggc cggcggatgg tgttctgcct ctggcgcagc 8040  
gtcagctacc gccgaaggcc tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac 8100  
agcctgtgat tggatgatcc gctcacgctc gaccgctacc tgttcagctg ccgcccgtg 8160  
ggcatgagca acggccaact ctcgttcaa 8189

<210> 54

<211> 8183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LNH2

&lt;400&gt; 54

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggt gtggagtca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtcgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaaggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccit 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtcggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacct ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggtatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440

cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgctcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg cggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatacag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tctactggtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgaggcc atgtgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggtt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgctgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180

aactgcagaa gatggcgggc gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataaact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920

aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgaggggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcacc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatgggt atgggtgatgt cctcgagatc taagcttga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6120  
ccgtccacgc tgctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6180  
ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctcct cagcccgggc ggccgtggga gcccgcctcg 6240  
atatgtacac ccgagaagct ccagcgtcc tcctgggccc cgatactcga ccaccacgca 6300  
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6360  
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6420  
caaccaccga ccacgttcc gctctgcgcg ccgtaccga cctacctcc gcagctcgaa 6480  
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgcctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6540  
ccaaccga gcacacctt tgaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tcgagggtt 6600  
ccagaagaaa tcgaacgac cagcgcggca aggttcaaaa agcagggggtt ggtggggagg 6660

aggttttggg ggggtgtgcc gggataacctg atatggcttt gttttgctga gtcgaataat 6720  
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtgggcgggc acagttgccc 6780  
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa tgggcggatg cgggtgttgc 6840  
tccgcaccgg ccgttcgcga cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6900  
cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6960  
catcgactgc gatcacgttg acgccgcgat gcgcgcattc gagcaaccat ccgaccatcc 7020  
ggcgccgaac tgggtcgcac aatcgccgtc cggccgcgca cacatcggat ggtggctcgg 7080  
ccccaaccac gtgtgccga cgcacagcgc ccgactgacg ccactgcgt acgcccaccg 7140  
catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7200  
caaaaaccg attcaccg attgggagac gatctacggc ccggccaccc cgtacacatt 7260  
gcggcagctg gccaccatcc acacaccg gcagatgccg cgtcggcccg atcgggcccgt 7320  
gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccg cgatgggcat accgcagtg 7380  
gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggaccat ctgctcctgc agcactgcca 7440  
cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcga 7500  
atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7560  
gcatctcgtt caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7620  
caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7680  
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cgggtgcctcc 7740  
actcgcaaa tccaacgctt gtttgctgag ccgcgtgacg attacctcgg ccgtgcgaaa 7800  
gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7860  
gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7920  
ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7980  
ccggcgctcg gcaactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 8040  
taccgccgaa ggcctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8100  
tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgccc gctgggcatg 8160  
agcaacggcc aactctcgtt caa 8183

<211> 8123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LCH1

<400> 55

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccg cgtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggt gtggagttca tcgaggctta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 480  
gaagatcgtc ggggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 540  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 600  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 660  
cattcgggac agcggtatgc agtcatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 720  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaag aggggtgggcc 780  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 840  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 900  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcgacgc tcggttcctc gacctcgatt 960  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1020  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1080  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac ccggttctca cgcttttaggc ttgacccccg 1140  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1200

agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1260  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1320  
aggcataggc ttggttatgc cgggtactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1380  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1440  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1500  
gctacttga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgttgattct 1560  
ctacgccga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1620  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1680  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1740  
gcatgcacca ttccttgccg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1800  
cctaatacag gattcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1860  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1920  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 1980  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2040  
cgccctcgt caagccttcg tcaactggcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2100  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2160  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttc ggcggcatcg ggatgcccgc 2220  
gttgcaggcc atgtgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2280  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2340  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccc ccctatacct 2400  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2460  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2520  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2580  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2640  
atcgtgctcc tgtcgttag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2700  
gaatcatctg cgtttctcg acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2760  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2820  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2880  
gagtgcggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 2940

gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3000  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccg 3060  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3120  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3180  
acctaccccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3240  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3300  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccg 3360  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3420  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3480  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3540  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3600  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtcgc accccacggc tctctccgg 3660  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3720  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3780  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3840  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3900  
atttccgtgt cgcccttatt ccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 3960  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4020  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4080  
caatgatgag cactttttaa gtctgtctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4140  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 4200  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4260  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4320  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaa 4380  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4440  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4500  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4560  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4620  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4680



aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4740  
attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4800  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4860  
aacgtgagtt ttcgtttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4920  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 4980  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5040  
gcagagcgca gataccaaat actgtttctt tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5100  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgtttacca gtggctgctg 5160  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5220  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5280  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5340  
gaaaggcgga caggatatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5400  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5460  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5520  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggcccttttg tcacatgttc tttcctgcgt 5580  
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc 5640  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5700  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5760  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg gggtagaacg 5820  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5880  
cgcggtgttc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 5940  
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttga tccgcggccg 6000  
ctacgtagaa ttcccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6060  
ccgtccacgc tgcctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6120  
ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc ggccgtggga gccgcctcg 6180  
atatgtacac ccgagaagct cccagcgtcc tcctgggccc cgatactcga ccaccacgca 6240  
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6300  
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6360  
caaccaccga ccacgttcc gctctgcgcg ccgtaccga cctacctcc gcagctcga 6420

gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6480  
cccaaccga gcacacctt tgcaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tgcagggtt 6540  
ccagaagaaa tcgaacgac cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6600  
aggttttggg ggggtgtgcc gggatactg atatggcttt gttttgcgta gtcgaataat 6660  
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtgggcgggc acagttgccc 6720  
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcgga tgggcggatg cgggtgttgc 6780  
tccgcaccgg ccgttcgcga cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6840  
cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6900  
catcgactgc gatcacgtt acgccgcgat gcgcgcattc gagcaacat ccgaccatcc 6960  
ggcgccgaac tgggtcgcac aatcgccgtc cggccgcgca cacatcggat ggtggctcgg 7020  
ccccaaccac gtgtgccga ccgacagcgc ccgactgacg cactgctc acgcccaccg 7080  
catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7140  
caaaaacccg attaccccg attgggagac gatctacggc ccggccacc cgtacacatt 7200  
gcggcagctg gccaccatcc acacaccccg gcagatgccg cgtcggcccg atcgggccgt 7260  
gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccgg cgatgggcat acccgagtg 7320  
gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggacat ctctcctgc agcactgcca 7380  
cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcgca 7440  
atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7500  
gcatctcgtt caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgc aaacaagaag ccgtccgaaa 7560  
caatgcaaga aagtacgac aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7620  
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cgggtgcctcc 7680  
actcgcaaa tccaacgctt gtttctgag ccgcgtgacg attacctcg ccgtgcgaaa 7740  
gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7800  
gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7860  
ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7920  
ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atgggtttct gcctctggcg cagcgtcagc 7980  
taccgccgaa ggcctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8040  
tgattggatg atccgtcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgcc gctgggcatg 8100  
agcaacggcc aactctcgtt caa 8123

<210> 56

<211> 8184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LCH2

<400> 56

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgctg cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccg cgtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggctta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020

cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc cttgatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgcctcgcttc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttggggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtcgata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccc .ttatgattct tctcgcttc ggcggcatcg ggatgccccg 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgcgttag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760

gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acagggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcagggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcgga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tctactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatitgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttcgtgt cgcccttatt ccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaagcagc agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500

caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctgggt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acgggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccgataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccgggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgtt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcacc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg tatactcct tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagac 6120  
gccgtccacg ctgcctctc acgtgacgtg aggtgcaagc ccggacgttc cgcgtgccac 6180  
gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggg cggccgtggg agcccgcctc 6240

gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc ctcttgggcc gcgatactcg accaccacgc 6300  
acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg 6360  
cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccgagc agaagagtga 6420  
acaaccaccg accacgttc cgctctgcgc gccgtaccg acctacctcc cgcagctcga 6480  
agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac ccgcctgtgc tcaccatcca ccgacgcaa 6540  
gcccacccg agcacacctc ttgcaccaag gtgccgaccg tggctttccg ctgcgagggt 6600  
tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc aaggttcaaa aagcaggggt tgggtggggag 6660  
gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct gatattgctt tgttttgcgt agtcgaataa 6720  
ttttccatat agcctcggcg cgtcggactc gaatagttga tgtgggcggg cacagttgcc 6780  
ccatgaaatc cgcaacgggg ggcgtgtga gcgatcggca atgggcggat gcggtgttgc 6840  
ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc tccaacgagg tcagtaccgg atgagccgcg 6900  
acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc attcaccgca cgcgttgctc ggatctatcg 6960  
tcatcgactg cgatcacgtt gacgccgga tgccgcgatt cgagcaacca tccgaccatc 7020  
cggcgccgaa ctgggtcgca caatgccgt ccggccgcgc acacatcgga tgggtggctcg 7080  
gccccacca cgtgtgccgc accgacagcg cccgactgac gccactgcgc tacgcccacc 7140  
gcatcgaac cggcctcaag atcagcgtcg gcggcgattt cgcgtatggc gggcaactga 7200  
ccaaaaacc gattcacccc gattgggaga cgatctacgg cccggccacc ccgtacacat 7260  
tgccgcagct ggccaccatc cacacacccc ggcagatgcc gcgtcggccc gatcgggccc 7320  
tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg acgccaccg gcgatgggca taccgcagt 7380  
ggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg actgggacca tctcgtcctg cagcactgcc 7440  
acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac tgccgttcac cgaagtacgc gccaccgcgc 7500  
aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt tcaccgaaga acagtaccga gcccgacaag 7560  
cgcatctcgg tcaaaaaggc ggcaaggcaa cgacactcgc caaacaagaa gccgtccgaa 7620  
acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga tgcgagaggc gattatctga tgggcggagc 7680  
caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc agcagcagca gccgaaaaat tcggtgcctc 7740  
cactcgcaca atccaacgtt tgtttgtga gccgcgtgac gattacctcg gccgtgcgaa 7800  
agctcgcctg gacaaagctg tcgagctgcg gaagcagggg ttgaagtacc gggaaatcgc 7860  
cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt cggccgatta ctgcacgacg cccgcaggca 7920  
cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc gtaaccaagt cagcgggttg tcgggttccg 7980

gccggcgctc ggcactcgga ccggccggcg gatggtgttc tgcctctggc gcagcgtcag 8040  
 ctaccgccga aggcctgtca tcgaccggct tcgactgaag tatgagcaac gtcacagcct 8100  
 gtgattggat gatccgtca cgctcgaccg ctacctgttc agctgccgcc cgctgggcat 8160  
 gagcaacggc caactctcgt tcaa 8184

<210> 57

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN389

<400> 57

gttgtacaag catggggact cgccgc

26

<210> 58

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN390

<400> 58

gtagatctcc tccgactgca tcaacggcg

29



<210> 59

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN391

<400> 59

accgttaacc atcagtactt ggcgtggtg

29

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN321

<400> 60

gaagctgacc aagttctc

18

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN335

<400> 61

gcccgaggca catcggaatt catg

24

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN336

<400> 62

accgacactg acgccgatga acga

24

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN349

<400> 63

cagcatgaac gtgatgagga atgtcagaag

30

<210> 64

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN351

<400> 64

ttcgaggtct tgctggtcac acgcatcgtg

30

<210> 65

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN361

<400> 65

aagagctctc tagacgcac cgaaacctcc accc

34

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN362

<400> 66

acaacatgaa ctcggatgtg c

21

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN363

<400> 67

ccggactcat accggacatg g

21

<210> 68

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN364

<400> 68

aaactagtca tggtcgctgt agtggaactc ac

32

<210> 69

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN368

<400> 69

aacgttgtct ttatgttgga tc

22

<210> 70

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN373

<400> 70

aatgtacaag ttaacgaccg cgcgggtccc ggacg

35

<210> 71

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer MCS-1a

<400> 71

```
catgggccac catcaccatc accatatggg aattctacgt agcggccgcg gatccaagct 60
tagatctctc gagcatcacc atcaccatca ctgaa                               95
```

<210> 72

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer MCS-1b

<400> 72

```
ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60
cgtagaattc ccatatggtg atggtgatgg tggcc                               95
```

<210> 73

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer MCS-2a

<400> 73

tatgggcat caccatcacc atcacgcat gggaattcta cgtagcggcc gcggatccaa 60  
gcttagatct ctgagcatc accatcacca tctactgaa 98

<210> 74

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer MCS-2b

<400> 74

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60  
cgtagaattc ccatggcgtg atggtgatgg tgatggccca 100

<210> 75

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN217

<400> 75

tgacgccgtc cattatacct cctcacgtg

29

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN218

<400> 76

gagaagggag cggccatggc

20

<210> 77

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN395

<400> 77

tttgttaact agagtaacgg gctactccg

29



<210> 78

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN396

<400> 78

aaggtacctc aacgacagga gcacgatc

28

<210> 79

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN397

<400> 79

actgttaacg catccgaaac ctccacccca ctc

33

<210> 80

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN398

<400> 80

ttgttacctc gctgtagtgg aactcaccga gcac

34

<210> 81

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN147

<400> 81

cgtgtacata tcgaggcggg ctccca

26

<210> 82

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN376

<400> 82

tttctagacg ccgtccatta tacctcctca cgtg

34

<210> 83

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN388

<400> 83

aaagttaacg agagttggcc gttgctc

27

<210> 84

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN120

<400> 84

gctgtacacc cgagaagctc ccagcg

26

<210> 85

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN160

<400> 85

aacatatgta tatctccttc ttaaagtaa ac

32

<210> 86

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN337

<400> 86

aaccatggct agcaaaggag aagaact

27

<210> 87

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN338

<400> 87

aagtgttggc caaggaacag gtag

24

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN339

<400> 88

gtcactactt tctcttatgg

20

<210> 89

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN340

<400> 89

ttagatcttt agtgatggtg atggtgatgt ttgtagagct catccatgcc atgtg

55

<210> 90

<211> 5987

<212> DNA

<213> *Rhodococcus erythropolis*

<220>

<223> endogenous plasmid pRE8424

<400> 90

gaattcgcgt tgaagcccgg cctctcgtag ctccattgcg acagtcgtgg agtcgtgcgc 60  
gttttgaatg gtctgccagg agtgcgacag atccacagat gcctgcttga tgacctgcat 120  
ctttcgttcg gtttctttgc gttgaatcat cgcgcgaaacc tctttctcgt ccatacggac 180  
agcttattga gtgatcaacc acaaaaagtg tgcagtcggt gacggtttgt gcagcaactg 240  
gacactacgc gatattatgt gtacggtttg aagtgtagat gaacaggtgt tgctgaatat 300  
ggacacttaa gtcataagct gtatcggact cgatcgaagg aactcgcagc aatgttcagc 360  
tcggaacgtc cctccccgtc gcaactaccg ctgatcagtt cccggtgttc gtggccggta 420  
tggaacgccc gatcaagccg gtgcaggaca agctcactcc cgatgggagc gtgaagtatt 480  
cgactgggtgc actgctccga gttgcacgca aagatggaac tgttgcgacg gataagacag 540  
catccgtgca cgtcatcaac ccgccgaatg agccgttcag cttcggcacg atctaccgag 600  
cagaaggcct tgtctgggtg cagccctaca tgacgggaat ggatcgtctc gcactgtcca 660  
tcacggtcga gaacctgggt ccaatgcctg cggcggccgt ctccgcacct gtcgtaaga 720  
gcgcggacgc atgacaaagc tggtttcacg aatcgcgata ccggttggtg ccttgctagt 780  
cggactgatt gttggtctga atattgttg cacacaagag attaagcttt ccagcgggaat 840  
gcaagagcgt cgggactcat gggctgaacg aacggtgacc tgggtgcagat ctctcttcc 900  
gacaggttct gttccatctg tcagtgcagc cagagagata ccgggatatg tccgagttag 960  
tccggaattg agcgccgatg ggatccagtg gactaaccac gatggacagg tcatacagtc 1020  
gccgtactcg aagaccagta cctgcggtga tgttccagtt cccgaagggt ggcgcgagc 1080  
ctatttgacc gtaaacagcc ctgtcccggt ctacaacgga acggaggctg agactgtccc 1140  
agaaacattg acgagcgagc gagtgcaaac caatctccag cttggaacct ccggatgcgc 1200  
tcttgtgcca gtcgagtcgt ggttgtggaa cgtggatgag caggtcgagg tagatagtc 1260

gaatgtcgtt gtggagtggc cccgatgagc aattacgaag ccgttcggcg cggtgaccag 1320  
gtacgaaggc gtacaacctg gcaaaticatg cgaggaaagc tcaaggcaaa aattgccgat 1380  
taccgattc tgtcctcgac gtttctgttg cttctcgtgc tgtacatctt cgacgtgag 1440  
atgtggctct tggccagtgt gctgctgggtg tgcgttggtg caatggtcta cctgagagac 1500  
cgaacgaagg ctggcgggcg caaacgtcgt acagctcgat ggtggcgagg aactccggaa 1560  
gttgacggtg ctggcgccaa tctcggtctg atcaattcct ctggacagcc tcctctcatt 1620  
cggagttata aattttcgga cgacggattg actcgatcag tcgctttcga ccttccgaca 1680  
ggcatcactg gggaagacat gacatcgaaa acggtcaaaa tagctgatgc tttcgggtgct 1740  
ctacgtgcca gtttcaccaa agtagagccg cgcaggggtg agctacttct gatcgacgca 1800  
gacactatit ctcaagcacg agatgcagca tggctcagt acgtcgagga ctcatcgcc 1860  
ggcacattga aggaagaggc cggcggcata cttggggaca atcggccttg gtgggagcaa 1920  
gaaaaggatc ttccgttcga caaaagcacg gacgcctgat ggatcaaaca gacacgatcc 1980  
cgattgcgat tggatggaac gaactagccc aacctgtcct ggtcgatata gccaaagatg 2040  
ctgctcactg gctcattcaa ggcaaaaccc gttccggaaa atctcaatgc acctacaacc 2100  
tgctcgaca ggctggatcg aatcccgctg tgcgtgtcgt cggagtcgat cccacttccg 2160  
tcttactagc cccattcgtc caccgaagac ccgctgaacc gaacatcgag ctcgactga 2220  
acgattttga caaagtcctc cgagtcctcc agttcgtcaa agcagaatcc gaccgacgaa 2280  
ttgagtgttt ctgggatcga cgcatagaca aaatttcttt gttctcgcca gcactacctc 2340  
tcactctgct tgtactggaa gaatttcccg gaatcatcga gggcgcacag gatttcgatg 2400  
caaccaacgg tctgaaacca gcagatagat acgcaccccg catcacatcg cttgttcgac 2460  
agattgctgc tcagtcggcc aaagcaggca tcagaatgtt gctcttggct caacgtgcgg 2520  
aagcttccat cgtgggcgga aacgctcgtc cgaatttcgc ggtgaaaatg actctccgcg 2580  
tagacgaacc tgaatctgtc aaaatgctgc accccaacgc aacacctgaa gagtgcgcac 2640  
tggtcgaagg attcgttcct ggacaaggct tcttcgacca acccgacta cggcgccaaa 2700  
tgatccgaac ggttcgcgta ggtgagtact cgacctacgc gagttacgtc gaaaacgcag 2760  
acctcgcgta tgaagccgca ctgaacatcg accgagcaca acgaatgaca atcgctcgg 2820  
aatacccaca tcttggcgac ataggctgac aaccgaacac acaggaggac ataccttgat 2880  
cggctacccg acagacgcaa tcccggtaaa cacctatatt cgacagcaat ttgagaaggt 2940  
tgcacatgag gcaggagaaa aacttgcttc acgccgaaac ctgcccacgg aacgagtcgt 3000

aacgactgca ctccggatca aatcaggctg gccgaatgat catctcgtaa taactgaaat 3060  
actcagggcc agagtaggtt tggaaggctca agctgtcggt gacgaacttc gcggcatgca 3120  
gatcaccgat gacgaccttg gtgcactagt cgggccacga tgggtcagtt cgatgaccgt 3180  
gttcgcaatg tctgagctgc ttctaggcga tgaactcgga aagctcaacg atttacgcgg 3240  
tgacgattgg aaacgtgcta gtgactcagc tgctgaagtt ggacgatcac tgggccttaa 3300  
atacgacatt tcggacagcg agggagccga acgagattgg tgcgctgctc gaggggaggc 3360  
atgggctgtc gcaatgcatg aacacctcga gggacgcgat ttcgaaactc tgactgcacc 3420  
gtggatcagt cttgtccgac cgaagtctgt tcaactcttc atggacaatg ctgatcgacc 3480  
gtcatttggt gccaggtct acgacgagct atgcagccat tctggaggtc atgcaattct 3540  
gagtgcagca gatcagaggg ttgatgcgtg aagcacgaag ctacgggtatt catccttctg 3600  
ctagctgtcg gcatttacga tcatcgcggg cctgatctgt ggggtggaca tgatgtctac 3660  
ggttggattt acgctggatg acgcgtgaa tcgtctgaaa ttcttgctgc gatgtgctgc 3720  
tattacaccc ccgactacgc ccgtgaagcc ggattcgaca ttgaagcact gggatgaatac 3780  
cggggtctgt tcgatgcact ggtgaagaca agcagaaccc cggaagagaa ggctggcggt 3840  
gtcgaagcat ggggactcgc cgcggactag cggcttcccg acacgccgta ctgaccagca 3900  
gatcagcgat aaacgtgtt tctgctggtt aagtggataa aaaccaaata atcgatgaac 3960  
ctcgaagtgg agtatccgag ctgaactagc tggatttact ccgaaaatac gagcggcgac 4020  
gaagggtgtt ggaccaccct gccgccgct tcgaggctcc tacttgacta ggaccccgct 4080  
cgttatgacc agcgtaagtg ctgaacacct ttccggcaaa gaccggcccc ctgtcctcgt 4140  
gtcgtccgat aagcgcgga tccggcacga acttcgacct aaacttcaac aaatcaccac 4200  
gtcagaaact tttaatgcgt gcggccggcc gatttccggc gtgaacggtg tgaccatcgt 4260  
caacgggtccc aaagggtccg gatttggagg ctttcgtcc tcggaagagg gctggatctg 4320  
cccctgctgt gcgggaaaag tcggcgaca tcgagcagac gaaatttctc aagtgttg 4380  
tcatcaactc gggactggat ctgttgcat ggtgaccatg accatgcgcc ataccgctgg 4440  
gcagcgtttg catgatttgt ggactggact ttccgcagcc tggaaagctg cgaccaatgg 4500  
ccgccgatgg cgtaccgaac gtgaaatgta cggctgcgac ggatacgtac gagctgttga 4560  
aatcactcac ggaaaaaacg gttggcacgt tcacgtccac gctctactca tgttcagcgg 4620  
tgacgtgagt gagaacatcc tcgaatcctt ctcggatgcg atgttcgatc ggtggacctc 4680  
caaactcgtg tctctgggat ttgtgcgcc actacgtaat tcaggtggac tcgacgtaag 4740



aaagattggt ggagaagctg accaagttct cgctgcatac ctgacgaaaa ttgcatccgg 4800  
ggtcggcatg gaagtcggca gtggcgacgg aaaaagtggc cggcacggca accgtgcacc 4860  
ttgggaaatc gccgttgatg cagtcggagg ggatccacaa gcgttggaac tctggcgcca 4920  
gtttgagttc ggttcgatgg gacgccgagc aatcgcatgg tctcgtggac tgcgcgcccc 4980  
agctgggtctt ggcgtagaac tcacggatgc tcagattgtc gaacaggaag aatctgcccc 5040  
ggtcatgggt gcgatcattc cggctcggtc ctggatgatg attcggaact gtgcgcctta 5100  
cgttttcgga gagatccttg gactcgtgga agcggggcgcg acctgggaaa accttcgtga 5160  
ccacttgcac tatcgattgc ctgcagcgga tgtgcggcct ccgataatat cgattcgtaa 5220  
gtgaaatgtc ttggtgtgca acaactttca ctcgtatgaa ccacacttga gggcatcccc 5280  
ccgatacttg ccgctttgaa gctgggtgtc tctctgtcag ggctgcgata gcaccgcgta 5340  
gcggtctggc cttgacagag agacggcctg tttcatgggt ggtctcgggg ggctgaccgg 5400  
gcagatagaa aaaggccggc cgatttggct gccgactatt tttgcaggta aacctatctc 5460  
atgagcatca atgaacgtcc cgttgggtatc gcagcgaatg cagcttcggt agacgtcgat 5520  
ggcgttgtga tgggtgtgta tctctcgctt tatgggcaag aaatcacgct agatcgagat 5580  
gatgcgttcc tactcctcga tcgacttcag gacgcgttgc gacctcaagc caactaagaa 5640  
ccctccagat ggtctaaacg aggcgcaaac tcgctcctgg gcctgcgggc ggagcaccga 5700  
agcgcgagcg aagcggagcg cgtaggtggg ggagcctgcg ggcagcggcg gcggagccgc 5760  
cgccttggtg ataggtgatc atcggggcca tagcaggtca gaggatgttt ttacgatgac 5820  
tcatgctcac cagccaagt actgatgtc gacggtgaaa catctgcaac ggtggcaacg 5880  
gttcggctgc tgacgtcaag ctcgtcaacg agaaaacgag aaatggattt gcgcagctca 5940  
gaggcagttc ccactactga tgtgatgtct gccagagcct gtagcca 5987

<210> 91

<211> 8207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

## &lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pTip-QT1

&lt;400&gt; 91

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgc agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atccccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggtatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagacac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560

gctacttggga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg cggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtcgata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtcctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcttggtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcattggcg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgcg 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacct caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggg gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcgggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgtttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcg cgccctgctc gacgacccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300

aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcggggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tctctcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag 5040

cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttctg ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtcctcgc accggcacc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatgggt atggtgatgc tcgagagatc taagcttga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg gtgatggta tggtagccca tggatatct ctttcttaa 6120  
gttaaacaaa attatttcta gacccgtcc acgtgcctc ctcacgtgac gtgagggtgca 6180  
agcccgagc ttccgcgtgc cacgccgtga gccgccgcgt gccgtcggct ccctcagccc 6240  
gggcggccgt gggagccccgc ctcgatatgt acaccgaga agctcccagc gtcctcctgg 6300  
gccgcgatac tcgaccacca cgcacgcaca ccgactaac gattcggccg gcgctcgatt 6360  
cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg gccggcgctc 6420  
gattcggccg agcagaagag tgaacaacca ccgaccacgc ttccgctctg cgcgccgtac 6480  
ccgacctacc tccgcagct cgaagcagct cccgggagta ccgccgtact caccgcctg 6540  
tgctcaccat ccaccgacgc aaagcccaac ccgagcacac ctcttgacc aagtgccga 6600  
ccgtggcttt ccgctcgcag ggttccagaa gaaatcgaa gatccagcgc ggcaagggtc 6660  
aaaaagcagg ggttggtggg gaggagggtt tggggggtgt cgccgggata cctgatatgg 6720  
ctttgttttg cgtagtcgaa taattttcca tatagcctcg gcgcgtcgga ctcgaatagt 6780

tgatgtgggc gggcacagtt gccccatgaa atccgcaacg gggggcgtgc tgagcgatcg 6840  
gcaatgggcg gatgcggtgt tgcttccgca ccggccgttc gcgacgaaca acctccaacg 6900  
aggtcagtac cggatgagcc gcgacgacgc attggcaatg cggtagctcg agcattcacc 6960  
gcacgcgttg ctcgatcta tcgtcatcga ctgcgatcac gttgacgccg cgatgcgcgc 7020  
attcgagcaa ccatccgacc atccggcgcc gaactgggtc gcacaatcgc cgtccggccg 7080  
cgcacacatc ggatggtggc tcggcccaa ccacgtgtgc cgcaccgaca gcgcccact 7140  
gacgccactg cgctacgcc accgcatcga aaccggcctc aagatcagcg tcggcgcgca 7200  
tttcgcgtat ggcgggcaac tgaccaaaaa cccgattcac cccgattggg agacgatcta 7260  
cggcccggcc acccgtaca cattgcggca gctggccacc atccacacac cccggcagat 7320  
gccgcgtcgg ccgatcggg ccgtgggcct gggccgcaac gtcacatgt tcgacgccac 7380  
ccggcgatgg gcataccgc agtggtggca acaccgaaac ggaaccggcc gcgactggga 7440  
ccatctcgtc ctgcagcact gccacgccgt caacaccgag ttcacgacac cactgccgtt 7500  
caccgaagta cgcgccaccg cgcaatccat ctccaaatgg atctggcgca atttcaccga 7560  
agaacagtac cgagcccgac aagcgcatct cggtaaaaaa ggcggcaagg caacgacact 7620  
cgccaaacaa gaagccgtcc gaaacaatgc aagaaagtac gacgaacata cgatgcgaga 7680  
ggcgattatc tgatgggcgg agccaaaaat ccggtgcgcc gaaagatgac ggcagcagca 7740  
gcagccgaaa aattcgggtc ctccactcgc acaatccaac gcttgtttgc tgagccgcgt 7800  
gacgattacc tcggccgtgc gaaagctcgc cgtgacaaag ctgtcgagct gcggaagcag 7860  
gggttgaagt accgggaaat cgccgaagcg atggaactct cgaccgggat cgtcggccga 7920  
ttactgcacg acgcccgcag gcacggcgag atttcagcgg aggatctgtc ggcgtaacca 7980  
agtcagcggg ttgtcgggtt ccggccggcg ctcggcactc ggaccggccg gcggtggtg 8040  
ttctgcctct ggcgacgcgt cagctaccgc cgaaggcctg tcatcgaccg gtttcgactg 8100  
aagtatgagc aacgtcacag cctgtgattg gatgatccgc tcacgctcga ccgctacctg 8160  
ttcagctgcc gcccgctggg catgagcaac ggccaactct cgttcaa 8207

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 8211

&lt;212&gt; DNA

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pTip-QT2

&lt;400&gt; 92

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttgggtgat tgccgggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgctg cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccg cgtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accgggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720  
cattcgggac agcgggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380

aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgcctgcttc 1560  
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg cggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgccg cggcgggtgt caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatacag gagtcgata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgt caagccttcg tctactggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttc ggcgccatcg ggatgcccgc 2280  
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120



ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gggggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ecgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tctctccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ctttctgtt ttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaagcagc agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860

tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040  
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtaggt 6000  
cgactagttc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggc gtgatggtga tggtagtgcc ccatatgtat atctccttct 6120  
taaagttaaa caaaattatt tctagacgcc gtccacgctg cctcctcacg tgacgtgagg 6180  
tgcaagcccg gacgttccgc gtgccacgcc gtgagccgcc gcgtgccgtc ggctccctca 6240  
gcccgggcgg ccgtgggagc ccgcctcgat atgtacaccc gagaagctcc cagcgtcctc 6300  
ctgggccgcg atactcgacc accacgcacg cacaccgcac taacgattcg gccggcgctc 6360  
gattcggccg gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6420  
gctcgattcg gccgagcaga agagtgaaca accaccgacc acgcttccgc tctgcgcgcc 6480  
gtacccgacc tacctccgc agctcgaagc agtcccggg agtaccgccg tactcaccgc 6540  
cctgtgctca ccatccaccg acgcaaagcc caaccgagc acacctctg caccaagggtg 6600

ccgaccgtgg ctttccgctc gcagggttcc agaagaaatc gaacgatcca gcgcggcaag 6660  
gttcaaaaag caggggttgg tggggaggag gttttggggg gtgtcgccgg gataacctgat 6720  
atggctttgt tttgcgtagt cgaataattt tccatatagc ctcggcgcgt cggactcgaa 6780  
tagttgatgt gggcgggcac agttgcccc tgaatccgc aacggggggc gtgctgagcg 6840  
atcggcaatg ggcggatgcg gtgttgcttc cgcaccggcc gttcgcgacg aacaacctcc 6900  
aacgaggtca gtaccggatg agccgcgacg acgcattggc aatgcggtac gtcgagcatt 6960  
caccgcacgc gttgctcgga tctatcgtca tcgactgca tcacgttgac gcccgcatgc 7020  
gcgcattcga gcaaccatcc gaccatccgg cgccgaactg ggtcgcacaa tcgccgtccg 7080  
gccgcgcaca catcgatgg tggctcggcc ccaaccacgt gtgccgcacc gacagcgccc 7140  
gactgacgcc actgcgtac gcccaccgca tcgaaaccgg cctcaagatc agcgtcggcg 7200  
gcgatttcgc gtatggcggg caactgacca aaaaccgat tcaccccgat tgggagacga 7260  
tctacggccc ggccaccccg tacacattgc ggcagctggc caccatccac acacccggc 7320  
agatgccgcg tcggcccgat cgggccgtgg gcctgggccc caacgtcacc atgttcgacg 7380  
ccacccggcg atgggcatac ccgcagtggg ggcaacaccg aaacggaacc ggccgcgact 7440  
gggaccatct cgtcctgcag cactgccacg ccgtcaacac cgagttcacg acaccactgc 7500  
cgttcaccga agtacgcgcc accgcgcaat ccatctccaa atggatctgg cgcaattica 7560  
ccgaagaaca gtaccgagcc cgacaagcgc atctcggtca aaaaggcggc aaggcaacga 7620  
cactcgccaa acaagaagcc gtccgaaaca atgcaagaaa gtacgacgaa catacgatgc 7680  
gagaggcgat tatctgatgg gcggagccaa aaatccggtg cgccgaaaga tgacggcagc 7740  
agcagcagcc gaaaaattcg gtgcctccac tcgcacaatc caacgcttgt ttgctgagcc 7800  
gcgtgacgat tacctcggcc gtgcgaaagc tcgccgtgac aaagctgtcg agctgcggaa 7860  
gcaggggttg aagtaccggg aaatcgccga agcgatggaa ctctcgaccg ggatcgtcgg 7920  
ccgattactg cacgacgccc gcaggcacgg cgagatttca gcggaggatc tgtcggcgta 7980  
accaagtcag cgggttgtcg ggttccggcc ggcgctcggc actcggaccg gccggcggat 8040  
ggtgttctgc ctctggcgca gcgtcagcta ccgccgaagg cctgtcatcg accggcttcg 8100  
actgaagtat gagcaacgtc acagcctgtg attggatgat ccgctcacgc tcgaccgcta 8160  
cctgttcagc tgccgcccgc tgggcatgag caacggccaa ctctcgttca a 8211

<210> 93

<211> 8275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RT1

<400> 93

gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccg cgtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agtcatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgtgttc ggcagcgaaa agggtgggccc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgacccccg 1200

agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acacccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ctttcaacc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgc 2280  
gttgccaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat caggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcc ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtcgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700  
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940

gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tggttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgttg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactcccg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440  
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680

cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cggtgggttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggtcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcggga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttctcg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggg ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtagg tcaccaaccg gggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagttc agtgatgggt atggatgatgc tcgagagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatatg gtgatgggtga tggtagccca tggatatct ctttcttaaa 6120  
gttaaacaaa attatttcta gacgccgtcc acgctgcctc ctcacgtgac gtgaggtgca 6180  
agcccggacg ttccgcgtgc cagccgtga gccgccgct gccgtcggct ccctcagccc 6240  
gggcggccgt gggagcccg ctcgatatgt acaagcatgg ggactcgccg cggactagcg 6300  
gcttcccgac acgccgtact gaccagcaga tcagcgataa acgctgtttc tgctgggtta 6360  
gtggataaaa accaaataat cgatgaacct cgaggtggag tatccgagct gaactagctg 6420

gatttactcc gaaaatacga gcggcgacga aggggtgttg accaccctgc cgccgccttc 6480  
gaggctccta cttgactagg accccgctcg ttatgaccag cgtaagtgt gaacaccttt 6540  
ccggcaaaga ccggccccct gtcctcgtgt cgtccgataa gcgcggcatc cggcacgaac 6600  
ttcgacccaa acttcaacaa atcaccacgt cagaaacttt taatgcgtgc ggccggccga 6660  
tttccggcgt gaacgggtgtg accatcgtca acggtcceaa aggttccgga tttggaggcc 6720  
ttcgctcctg cggaaggggc tggatctgcc cctgctgtgc gggaaaagtc ggcgcacatc 6780  
gagcagacga aatttctcaa gttgttgctc atcaactcgg gactggatct gttgcgatgg 6840  
tgaccatgac catgcgcat accgctgggc agcgtttgca tgatttgtgg actggacttt 6900  
cggcagcctg gaaagctgcg accaatggcc gccgatggcg taccgaacgt gaaatgtacg 6960  
gctgcgacgg atacgtacga gctgttgaaa tcactcacgg aaaaaacggt tggcacgttc 7020  
acgtccacgc tctactcatg ttacgcggtg acgtgagtga gaacatcctc gaatccttct 7080  
cggatgcgat gttcgatcgg tggacctcca aactcgtgtc tctgggattt gctgcgccac 7140  
tacgtaattc aggtggactc gacgtaagaa agattggtgg agaagctgac caagtctcgc 7200  
ctgcatacct gacgaaaatt gcatccgggg tcggcatgga agtcggcagt ggcgacggaa 7260  
aaagtggtcg gcacggcaac cgtgcacctt gggaaatcgc cgttgatgca gtcggaggag 7320  
atccacaagc gttggaactc tggcgcgagt ttgagttcgg ttcgatggga cgccgagcaa 7380  
tcgcatggtc tcgtggactg cgcgcccag cttggtcttg cgtagaactc acggatgctc 7440  
agattgtcga acaggaagaa tctgccccgg tcatggttgc gatcattccg gtcggtcct 7500  
ggatgatgat tcggaactgt gcgccttacg ttttcggaga gatccttgga ctcgtggaag 7560  
cgggcgcgac ctgggaaaac cttcgtgacc acttgcatta tcgattgcct gcagcggatg 7620  
tgcggcctcc gataatatcg attcgtagt gaaatgtctt ggtgtgcaac aactttcact 7680  
cgtatgaacc acacttgagg gcatccccc gatacttgcc gctttgaagc tgggtgtctc 7740  
tctgtcaggg ctgcgatagc accgcgtagc ggcttggcct tgacagagag acggcctgtt 7800  
tcatggttgg tctcgggggg ctgaccgggc agatagaaaa aggccggccg atttggtcgc 7860  
cgactatttt tgcaggtaaa cccatctcat gagcatcaat gaacgtcccg ttggtatcgc 7920  
agcgaatgca gcttcggtag acgtcgatgg cgttgtgatg ggtgtgtatc tctcgttta 7980  
tgggcaagaa atcacgctag atcgagatga tgcgttccta ctctcgatc gacttcagga 8040  
cgcgttgca cctcaagcca actaagaacc ctccagatgg tctaaacgag gcgcaaactc 8100  
gctcctgggc ctgcgggcgg agcaccgaag cgcgagcgaa gcggagcgcg taggtggggg 8160



agcctgcggg cagcggcggc ggagccgccg ccttggtaat aggtgatcat cggggccata 8220  
gcaggtcaga ggatgttttt acgatgactc atgctcacca cgccaagtac tgatg 8275

<210> 94

<211> 8279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RT2

<400> 94

gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctgtctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atccccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960

tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacgggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1200  
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260  
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320  
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380  
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440  
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500  
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560  
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acacccgtcc tgtggattct 1620  
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1680  
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggtca tgagcgcttg 1740  
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800  
gcatgcacca ttccttgcgg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860  
cctaatacgag gattcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920  
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980  
ctttatcatg caactcgtag gacagggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040  
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100  
cgccctcgct caagccttcg tcaactgggtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160  
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220  
aggctggatg gccttcccc ttatgattct tctcgcttc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280  
gttgaggcc atgtgtcca ggcaggtaga tgacgacat cagggacagc ttcaaggatc 2340  
gctcgcggt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400  
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460  
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520  
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580  
cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640  
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700

atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760  
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta ctigcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820  
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880  
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940  
gagtgcagggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000  
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060  
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120  
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcgga 3180  
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240  
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300  
aggaggtccg ggaacgtgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360  
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcaccggc 3420  
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480  
ccgaggacca ccggcagggc atgccccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540  
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600  
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660  
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactcccgg 3720  
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgccctccgtc 3780  
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840  
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900  
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960  
atttccgtgt cgcccttatt ccttttttg cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc 4020  
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080  
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140  
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200  
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260  
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc 4320  
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380  
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440

cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500  
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560  
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620  
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680  
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740  
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800  
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860  
ttaaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5040  
cgggtggtttg ttigccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100  
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccattca 5160  
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccgataagg 5280  
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcgagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580  
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640  
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgtcgc 5700  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760  
gcaaaccgcc tctccccgcg cggtggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820  
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgttg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880  
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgtt gtgcaggttt 5940  
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcacc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000  
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc taagcttgga tccgcggccg 6060  
ctacgtagaa ttcccatggc gtgatggtga tggatgatgc ccatatgtat atctccttct 6120  
taaagttaaa caaaattatt tctagacgcc gtccacgctg cctcctcacg tgacgtgagg 6180

tgcaagccccg gacgttccgc gtgccacgcc gtgagccgcc gcgtgccgtc ggctccctca 6240  
gcccggggcgg ccgtgggagc ccgcctcgat atgtacaagc atggggactc gccgcggact 6300  
agcggcttcc cgacacgccg tactgaccag cagatcagcg ataaacgctg tttctgctgg 6360  
ttaagtggat aaaaaccaa taatcgatga acctcgaagt ggagtatccg agctgaacta 6420  
gctggattta ctccgaaaat acgagcggcg acgaagggtg ttggaccacc ctgccgccgc 6480  
cttcgaggct cctacttgac taggaccccc ctcgttatga ccagcgtaag tgctgaacac 6540  
ctttccggca aagaccggcc ccctgtcctc gtgtcgtccg ataagcgcgg catccggcac 6600  
gaacttcgac caaacttca acaaatcacc acgtcagaaa cttttaatgc gtgcggccgg 6660  
ccgatttccg gcgtgaacgg tgtgaccatc gtcaacggtc ccaaagggtc cggatttggga 6720  
ggccttcgct cctgcggaaa gggctggatc tgcccctgct gtgcgggaaa agtcggcgca 6780  
catcgagcag acgaaatttc tcaagttgtt gctcatcaac tcgggactgg atctgttgcg 6840  
atggtgacca tgaccatgcg ccataccgct gggcagcggt tgcatgattt gtggactgga 6900  
ctttcggcag cctggaaagc tgcgaccaat ggccgccgat ggcgtaccga acgtgaaatg 6960  
tacggctgcg acggatacgt acgagctggt gaaatcactc acggaaaaaa cggttggcac 7020  
gttcacgtcc acgctctact catgttcagc ggtgacgtga gtgagaacat cctcgaatcc 7080  
ttctcggatg cgatgttcga tcggtggacc tccaaactcg tgtctctggg atttgctgcg 7140  
ccactacgta attcaggtgg actcgacgta agaaagattg gtggagaagc tgaccaagtt 7200  
ctcgtgcat acctgacgaa aattgcatcc ggggtcggca tggaagtcgg cagtggcgac 7260  
ggaaaaagtg gtcggcacgg caaccgtgca ccttgggaaa tcgccgttga tgcagtcgga 7320  
ggagatccac aagcgttggga actctggcgc gagtttgagt tcggttcgat gggacgccga 7380  
gcaatcgcat ggtctcgtgg actgcgcgcc cgagctggtc ttggcgtaga actcacggat 7440  
gctcagattg tcgaacagga agaattgcc ccggtcatgg ttgcgatcat tccggctcgg 7500  
tcctggatga tgattcggaa ctgtgcgcct tacgttttcg gagagatcct tggactcgtg 7560  
gaagcgggcg cgacctggga aaaccttcgt gaccatttgc attatcgatt gcctgcagcg 7620  
gatgtcggc ctccgataat atcgattcgt aagtgaatg tcttgggtg caacaacttt 7680  
cactcgtatg aaccacactt gagggcatcc cccgatact tgccgcttg aagctgggtg 7740  
tctctctgtc agggctgcga tagcaccgcg tagcggcttg gccttgacag agagacggcc 7800  
tgtttcatgg ttggtctcgg ggggctgacc gggcagatag aaaaaggccg gccgatttgg 7860  
ctgccgacta tttttgcagg taaaccatc tcatgagcat caatgaacgt cccgttggta 7920

tcgcagcgaa tgcagcttcg gtagacgtcg atggcggttg gatgggtgtg tatctctcgc 7980  
tttatgggca agaaatcacg ctagatcgag atgatgcgtt cctactcctc gatcgacttc 8040  
aggacgcgtt gcgacctcaa gccaaactaag aaccctccag atggtctaaa cgaggcgcaa 8100  
actcgtcctt gggcctgcgg gcggagcacc gaagcgcgag cgaagcggag cgcgtagggtg 8160  
ggggagcctg cgggcagcgg cggcggagcc gccgccttgg taatagggtga tcatcggggc 8220  
catagcaggt cagaggatgt ttttacgatg actcatgctc accacgcaa gtactgatg 8279

<210> 95

<211> 8384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-QC1

<400> 95

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatecgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggt gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgagc cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccctt 720

cattcggggac agcgggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcata cgaaacctcc acccactca cctagtccga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctaggttc aagaccatgt 1260  
ccagcccga ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320  
cgcccgaacg tcacgtctt gtgtggcctt cccttgttgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcgagt ctggcctcgg ctgcgcacat ctcgcactgt gacgtgtca 1440  
ggtcaccgcg ttcgcggcta ccagttcctt tcatcgaatc gagcttccgg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg cccagggcac atccgagttc atgttgctcg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggt cccgccgcc ggactcctca cctccgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgctccgtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740  
gcgacgcgcc cttctgacat tcctcatcac gttcatgctg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggtct tgctggtcac acgcategtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttggca gtggccctgg gggcggcgat ggcgatggtg cccgccgaca tgaaagggcg 1920  
cgccacgtcc gtcctcctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccggtg ttcccggggg 1980  
cgccttcctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggctgtcg tcgtcatctc 2040  
cgccccgtca gtggtggcga ttatgttcgc caccgccgcc gagccgcttg cagagtccac 2100  
accgaatgcc aagcgtgaac tgctcctact gcgctcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgcccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcgttc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacaccggc cgttccaact 2340  
gctcgtgtc gggctccgag cactgttgac gggatggatc gtcttcgctc tcacggcatc 2400  
ccaccgccg gtgacattgg tgatgctgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460

ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtgc tgcactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcgcatg ggtctgagct accgcgcccc gctctggacg agcgccgcgc tggtagacct 2640  
cgcgatcgtc atcggcgag ccaccttgtc tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgctc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacaggt gtgtggagct 2820  
ctgccccctgc ctctttcacg cgaactcact gttcagtgcg gcgatacgtg ctcggtgagt 2880  
tccactacag cgaccatgac tagaattgat ctctcgtacc gccaatggg catctgagaa 2940  
tcatctgcgt ttctcgcacg caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acacccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060  
cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttcgccggag 3120  
tgacggtgcg cacgtgcac cactacgacg acatcggcct gctcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcgc tacagcgacg ccgacctga ccggtgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgtcgcagc aggtcgccgc cctgctcgc gaccggccg 3300  
cggacccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcggcggcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagttc gaggtcttcg gcgacttca ccccgaccag tacgaggagg 3480  
aggtccggga acgctggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtaaccaa ggaggactgg cagcgcatcc aggacgaggc cgacgagctc acccggcgt 3600  
tcgtcgccct gatggacgcg ggtgagcccc ccgactcca gggggcgatg gacgccgcg 3660  
aggaccaccg gcagggcatc gcccgcaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctgggcga gatgtacgtg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc 3780  
cgggcctcgc cgcctacatg cgcgacgca tcctcgccaa cgccgtccgg cacaccccct 3840  
gagcgggtgt cgtggcccgg gtctcccgcc cggtctcacc ccacggctca ctcccgggcc 3900  
acgaccaccg ccgtcccgtc cgcgcacacc tcggtgcccc cgccgcccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc cttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag 4200



aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg 4260  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgtatt gacgccgggc 4380  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctacagaatga cttggttgag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt ttgcacaaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4800  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag 4860  
cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttag ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcatTTTT 5040  
aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac 5100  
gtgagtttct gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220  
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag ttagaccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa 5580  
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640  
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700  
gtcgatTTTT gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940

aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgcccc a gcggttgtca ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtccgt ggcgctcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttgcaat ccctcgcacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccatatgggtg atggtgatgg tggcccatgg tataatctct tcttaaagtt 6300  
aaacaaaatt atttctagac gccgtccacg ctgcctctc acgtgacgtg aggtgcaagc 6360  
ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggg 6420  
cggccgtggg agcccgctc gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc ctctggggc 6480  
gcgatactcg accaccacgc acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg ctcgattcgg 6540  
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6600  
tcggccgagc agaagagtga acaaccaccg accacgcttc cgctctgcgc gccgtaccg 6660  
acctacctc cgcagctcga agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac ccgcctgtgc 6720  
tcaccatcca ccgacgcaaa gcccaaccg agcacacctc ttgcaccaag gtgccgaccg 6780  
tggctttccg ctgcgagggt tccagaagaa atcgacgat ccagcgcggc aaggttcaaa 6840  
aagcaggggt tgggtggggag gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct gatatggctt 6900  
tgttttgcgt agtcgaataa ttttccatat agcctcggcg cgctcgactc gaatagttga 6960  
tgtgggcggg cacagttgcc ccatgaaatc cgcaacgggg ggcgtgctga gcgatcggca 7020  
atgggcggat gcggtgttgc ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc tccaacgagg 7080  
tcagtaccgg atgagccgcg acgacgatt ggcaatgcgg tacgtcgagc attcaccgca 7140  
cgcgttgctc ggatctatcg tcatcgactg cgatcacgtt gacgccgcga tgcgcgcatt 7200  
cgagcaacca tccgaccatc cggcgccgaa ctgggtcgca caatgccgt ccggccgcgc 7260  
acacatcgga tgggtggctcg gcccaccca cgtgtgccgc accgacagcg cccgactgac 7320  
gccactgcgc tacgcccacc gcatcgaaac cggcctcaag atcagcgtcg gcggcgattt 7380  
cgcgtatggc gggcaactga ccaaaaaccc gattcacccc gattgggaga cgatctacgg 7440  
cccggccacc ccgtacacat tgcggcagct ggccaccatc cacacacccc ggcagatgcc 7500  
gcgtcggccc gatcgggccc tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg acgccacccg 7560  
gcgatgggca taccgcaggt ggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg actgggacca 7620  
tctcgtctg cagcactgcc acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac tgccgttcac 7680

cgaagtacgc gccaccgcgc aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt tcaccgaaga 7740  
acagtaccga gcccgacaag cgcattctcg tcaaaaaggc ggcaaggcaa cgacactcgc 7800  
caaacaagaa gccgtccgaa acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga tgcgagaggc 7860  
gattatctga tgggcgaggc caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc agcagcagca 7920  
gccgaaaaat tcggtgcctc cactcgcaca atccaacgct tgtttgctga gccgcgtgac 7980  
gattacctcg gccgtgcgaa agctcgccgt gacaaagctg tcgagctgcg gaagcagggg 8040  
ttgaagtacc gggaaatcgc cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt cggccgatta 8100  
ctgcacgacg cccgcaggca cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc gtaaccaagt 8160  
cagcgggttg tcgggttccg gccggcgctc ggcaactcga ccggccggcg gatggtgttc 8220  
tgcccttggc gcagcgtcag ctaccgccga aggcctgtca tcgaccggct tcgactgaag 8280  
tatgagcaac gtcacagcct gtgattggat gatccgctca cgctcgaccg ctacctgttc 8340  
agctgccgcc cgctgggcat gagcaacggc caactctcgt tcaa 8384

<210> 96

<211> 8388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-QC2

<400> 96

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgcccggt gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360

gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggg 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggaac cggcgctcctc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggc cgcgaggagg ccatcgccctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctccggttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcata cgaaacctcc accccactca cctagtccga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctagggtc aagaccatgt 1260  
ccagcccga ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320  
cgcccgaacg tcacgtcttt gtgtggcctt cccttgttgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcgagt ctggcctcgg ctgcgcacat ctgcactgt gacgtgtca 1440  
ggtcacccgc ttgcgggcta ccagttcctt tcatcgaatc gagcttccgg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatcctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg ccaggggcac atccgagttc atgttgtccg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggc cccgcccgc ggactcctca cctccgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgctccgtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740  
gcgacgcgcc cttctgacat tcctcatcac gttcatgctg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggtct tgctgggtcac acgcacgtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttggca gtggccctgg gggcgggcgat ggcgatggcg cccgccgaca tgaaagggcg 1920  
cgccacgtcc gtctctctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccggtg ttcccggggg 1980  
cgcttctctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggctgtcg tcgtcatctc 2040  
cgcccttgcga gtggtggcga ttatgttcgc caccgggcc gagccgcttg cagagtccac 2100

accgaatgcc aagcgtgaac tgtcctcact gcgctcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgcccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcgttc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacacccggc cgttccaact 2340  
gctcgtgtc ggggtccgag cactgttgac gggatggatc gtcttcgctc tcacggcatc 2400  
ccaccccgcg gtgacattgg tgatgctgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460  
ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtgc tgcactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcggcatg ggtctgagct accgcgcccc gctctggacg agcgccgcg tggtgacact 2640  
cgcgatcgtc atcggcgag ccacctgtc tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgtc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacaggt gtgtggagct 2820  
ctgcccctgc ctctttcacg cgaactcact gttcagtgcg gcgatactg ctcggtgagt 2880  
tcactacag cgaccatgac tagaattgat ctctcgacc gccaatggg catctgagaa 2940  
tcactgtcgt ttctcgacg caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acacccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060  
cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttccgggag 3120  
tgacggtgcg cacgtgcac cactacgacg acatcggcct gctcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcg tacagcgacg ccgacctga ccggtgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgctcgacg aggtcgccgc cctgctcgac gaccggccg 3300  
cggaccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcggcggcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagtgc gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg 3480  
aggtccggga acgtggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtacaccaa ggaggactgg cagcgcatcc aggacgaggc cgacgagctc acccggcgct 3600  
tcgtcgccct gatggacgcg ggtgagcccg ccgactccga gggggcgatg gacgccgccg 3660  
aggaccaccg gcagggcatc gcccgaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctgggcga gatgtacgtg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc 3780  
cgggcctcgc cgcctacatg cgcgacgcga tcctcgccaa cgccgtccgg cacaccccct 3840

gagcgggtggt cgtggcccggt gtctcccgcc cgggtctcacc ccacgggtca ctcccggggcc 3900  
acgaccaccg ccgtcccgtg cgcgcacacc tcgggtgcca cgtccgcccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgagg cattttgcct tctgtttttt gctcaccag 4200  
aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg 4260  
aactggatct caacagcgggt aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgtatt gacgccgggc 4380  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctgagaatga cttggttgag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 4800  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcatigcag 4860  
cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt 5040  
aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac 5100  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220  
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa 5580

aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640  
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700  
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
cctttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagt agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940  
aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgcccc gcggtggtca ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtccgt ggcgctcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttgcaat ccctcgcacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttgatcc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccatggcgtg atggtgatgg tgatggcca tatgtatatc tccttcttaa 6300  
agttaaaca aattatttct agacgccgtc cacgtgcct cctcacgtga cgtgaggtgc 6360  
aagcccggac gttccgcgtg ccacgccgtg agccgccgcg tgccgtcggc tccctcagcc 6420  
cgggcggccg tgggagccc cctcgatatg tacacccgag aagctcccag cgtcctcctg 6480  
ggccgcgata ctcgaccacc acgcacgac accgcactaa cgattcggcc ggcgctcgat 6540  
tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct 6600  
cgattcggcc gagcagaaga gtgaacaacc accgaccag cttccgctct gcgcgccgta 6660  
cccgcctac ctccgcagc tcgaagcagc tcccgggagt accgccgtac tcacccgcct 6720  
gtgctacca tccaccgacg caaagcccaa cccgagcaca cctcttgac caaggtgccg 6780  
accgtggctt tccgctcgca gggttccaga agaaatcgaa cgatccagcg cggcaagggt 6840  
caaaaagcag gggttggtgg ggaggagggt ttgggggggtg tcgccgggat acctgatatg 6900  
gctttgtttt gcgtagtcga ataattttcc atatagcctc ggcgcgctcg actcgaatag 6960  
ttgatgtggg cgggcacagt tgcccatga aatccgcaac ggggggctg ctgagcgatc 7020  
ggcaatgggc ggatgcggtg ttgcttccgc accggccgtt gcgacgaac aacctccaac 7080  
gaggtcagta ccgatgagc gcgacgacg cattggcaat gcggtacgtc gagcattcac 7140  
cgcacgcgtt gctcggatct atcgtcatcg actgcgatca cgttgacgcc gcgatgcgcg 7200  
cattcgagca accatccgac catccggcgc cgaactgggt cgcacaatcg ccgtccggcc 7260  
gcgcacacat cggatggtgg ctcggcccca accacgtgtg ccgcaccgac agcggccgac 7320

tgacgccact gcgctacgcc caccgcatcg aaaccggcct caagatcagc gtcggcggcg 7380  
atttcgcgta tggcgggcaa ctgaccaaaa acccgattca ccccgattgg gagacgatct 7440  
acggccccggc caccctgtac acattgcggc agctggccac catccacaca ccccggcaga 7500  
tgccgcgtcg gcccgatcgg gccgtgggccc tgggccgcaa cgtcaccatg ttcgacgcca 7560  
cccggcgatg ggcatacccg cagtgggtggc aacaccgaaa cggaaccggc cgcgactggg 7620  
accatctcgt cctgcagcac tgccacgccg tcaacaccga gttcacgaca ccaactgccgt 7680  
tcaccgaagt acgcgccacc gcgcaatcca tctccaaatg gatctggcgc aatttcaccg 7740  
aagaacagta ccgagccccga caagcgcatac tcggtcaaaa aggcggaag gcaacgacac 7800  
tcgccaacaa agaagccgtc cgaaacaatg caagaaagta cgacgaacat acgatgcgag 7860  
aggcgattat ctgatgggcg gagccaaaaa tccggtgcgc cgaaagatga cggcagcagc 7920  
agcagccgaa aaattcggtg cctccactcg cacaatccaa cgcttgtttg ctgagcccg 7980  
tgacgattac ctcggccgtg cgaaagctcg ccgtgacaaa gctgtcgagc tgcggaagca 8040  
gggggttgaag taccgggaaa tcgccgaagc gatggaactc tcgaccggga tcgtcggccg 8100  
attactgcac gacgcccga ggcacggcga gatttcagcg gaggatctgt cggcgtaacc 8160  
aagtcagcgg gttgtcgggt tccggccggc gctcggcact cggaccggcc ggcgatggt 8220  
gttctgcctc tggcgcagcg tcagctaccg ccgaaggcct gtcacgctcg ggcttcgact 8280  
gaagtatgag caacgtcaca gccgtgtgatt ggatgatccg ctcacgctcg accgctacct 8340  
gttcagctgc cgcccgctgg gcatgagcaa cggccaactc tcgttcaa 8388

<210> 97

<211> 8452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RC1

<400> 97



gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120  
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcggccggg gtggagtcca tcgaggctca cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagt acatcaccag catcgccgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctccggttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcac cgaaacctcc accccactca cctagtccga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctagggtc aagaccatgt 1260  
ccagcccga ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320  
cgcccgaacg tcacgtctt gtgtggcctt cccttggtgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcgagt ctggcctcgg ctgcgcacat ctgcactgt gacgtgtca 1440  
ggtcacccgc ttcgcggcta ccagttcctt tcatcgaatc gagcttccgg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg ccagggcac atccgagttc atgttgtccg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggg ccccgccgcc ggactcctca cctcgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgtccgtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740

gcgacgcgcc cttctgacat tctcatcac gttcatgctg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggtct tgctggtcac acgcatcgtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttggca gtggccctgg gggcgggcgat ggcgatgggtg cccgccgaca tgaaagggcg 1920  
cgccacgtcc gtcctcctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccgggtg ttcccggggg 1980  
cgcccttctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggctgtcg tcgtcatctc 2040  
cgcccttgca gtgggtggcg ttatgttcgc cccccggcc gagccgcttg cagagtccac 2100  
accgaatgcc aagcgtgaac tgcctcact gcgtcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcggtc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacacccggc cgttccaact 2340  
gtcgtgtgtc ggggtccgag cactgttgac gggatggatc gtcttcgtc tcacggcatc 2400  
ccaccccgcg gtgacattgg tgatgtgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460  
ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtc tgactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcggcatg ggtctgagct accgcgcccc gctctggacg agcgccgcgc tggtgacact 2640  
cgcgatcgtc atcggcgag ccacctgtc tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgtc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacaggt gtgtggagct 2820  
ctgcccctgc ctctttcacg cgaactcact gttcagtgcg gcgatacgtg ctcggtgagt 2880  
tccactacag cgacatgac tagaattgat ctctcgacc gccaattggg catctgagaa 2940  
tcactgtcgt ttctcgacg caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acacccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060  
cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttcgccggag 3120  
tgacgggtgcg cacgtgtcac cactacgacg acatcggcct gtcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcg ctagcgacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgtcgacg aggtcgccgc cctgctcgac gaccgggccg 3300  
cggacccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcggcggcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagtgc gaggtcttcg gcgacttga ccccgaccag tacgaggagg 3480

agggtccggga acgctggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtagaccaa ggaggactgg cagcgcatcc aggacgaggc cgacgagctc acccggcgct 3600  
tcgtcgccct gatggacgcg ggtgagcccg ccgactccga gggggcgatg gacgccgcg 3660  
aggaccaccg gcagggcatc gcccgaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctgggcga gatgtacgtg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc 3780  
cgggcctcgc cgcctacatg cgcgacgca tcctcgccaa cgccgtccgg cacaccccct 3840  
gagcgggtggt cgtggcccg gtcctccgcc cgggtctacc ccacggctca ctcccgggcc 3900  
acgaccaccg ccgtcccgtg cgcgcacacc tcggtgccca cgtccgccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc cttattccc tttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gtcaccag 4200  
aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg 4260  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaaaga cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc 4380  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcattttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaaattac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccattct gcgctcggcc cttccggctg 4800  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag 4860  
cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttaa ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt 5040  
aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac 5100  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220

tggtttgttt gccgatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatact gttaccagtg gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa 5580  
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640  
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700  
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940  
aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgcccc gcggtgggtc ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtccgt ggcgctcatt ccaacctccg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttgagc ccttcgcacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttgatcc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccataatggtg atggtgatgg tggcccatgg tataatctct tcttaaagtt 6300  
aaacaaaatt atttctagac gccgtccacg ctgcctcctc acgtgacgtg aggtgcaagc 6360  
ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgctgcc gtcggctccc tcagcccggg 6420  
cggccgtggg agcccgctc gatatgtaca agcatgggga ctgcccgcgg actagcggct 6480  
tcccgacacg ccgtactgac cagcagatca gcgataaacg ctgtttctgc tggttaagt 6540  
gataaaaacc aaataatcga tgaacctga agtggagtat ccgagctgaa ctagctggat 6600  
ttactccgaa aatacagcg gcgacgaagg gtgttgacc accctgccgc cgccttcgag 6660  
gtcctactt gactaggacc ccgctcgtta tgaccagcg aagtgtgaa cacctttccg 6720  
gcaaagaccg gcccctgtc ctcgtgtcgt ccgataagcg cggcatccgg cacgaacttc 6780  
gacccaaact tcaacaaatc accacgtcag aaacttttaa tgcgtgcggc cggccgattt 6840  
ccggcgtgaa cggtgtgacc atcgtcaacg gtcccaaagg ttccggattt ggaggccttc 6900  
gtcctgcgg aaagggtgg atctgccct gctgtcggg aaaagtgcgc gcacatcgag 6960

cagacgaaat ttctcaagtt gttgctcatc aactcgggac tggatctgtt gcgatggtga 7020  
ccatgaccat gcgccatacc gctgggcagc gtttgcata tttgtggact ggactttcgg 7080  
cagcctggaa agctgcgacc aatggccgcc gatggcgtag cgaacgtgaa atgtacggct 7140  
gcgacggata cgtacgagct gttgaaatca ctcacggaaa aaacggttgg cacgttcacg 7200  
tccacgctct actcatgttc agcggtagc tgagtgagaa catcctcgaa tccttctcgg 7260  
atgcgatgtt cgatcggtag acctccaaac tcgtgtctct gggatttgct gcgccactac 7320  
gtaattcagg tggactcgac gtaagaaaga ttggtggaga agctgaccaa gttctcgtctg 7380  
catacctgac gaaaattgca tccggggtag gcatggaagt cggcagtagc gacggaaaaa 7440  
gtggtcggca cggcaaccgt gcaccttggg aaatcgccgt tgatgcagtc ggaggagatc 7500  
cacaagcgtt ggaactctgg cgcgagtttg agttcggttc gatgggacgc cgagcaatcg 7560  
catggtctcg tggactgcgc gcccgagctg gtcttggcgt agaactcacg gatgctcaga 7620  
ttgtcgaaca ggaagaatct gccccggtca tggttgcgat cattccggct cggctcctgga 7680  
tgatgattcg gaactgtgcg ccttacgttt tcggagagat ccttggactc gtggaagcgg 7740  
gcgcgacctg ggaaaacctt cgtgaccact tgcattatcg attgcctgca gcggatgtgc 7800  
ggcctccgat aatatcgatt cgtaagtga atgtcttggg gtgcaacaac tttcactcgt 7860  
atgaaccaca cttgagggca tcccccgat acttgccgtt ttgaagctgg gtgtctctct 7920  
gtcagggctg cgatagcacc gcgtagcggc ttggccttga cagagagacg gcctgtttca 7980  
tggttggtct cggggggctg accgggcaga tagaaaaagg ccggccgatt tggctgccga 8040  
ctatTTTTgc aggtaaacct atctcatgag catcaatgaa cgtcccgttg gtatcgcagc 8100  
gaatgcagct tcggtagacg tcgatggcgt tgtgatgggt gtgtatctct cgctttatgg 8160  
gcaagaaatc acgctagatc gagatgatgc gttcctactc ctcgatcgac ttcaggacgc 8220  
gttgcgacct caagccaact aagaaccctc cagatggtct aaacgaggcg caaactcgtc 8280  
cctgggcctg cgggcgggagc accgaagcgc gagcgaagcg gagcgcgtag gtgggggagc 8340  
ctgcgggcag cggcggcgga gccgccgcct tggtaatagg tgatcatcgg ggccatagca 8400  
ggtcagagga tgTTTTtacg atgactcatg ctcaccacgc caagtactga tg 8452

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 8456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-RC2

<400> 98

gttaacgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60  
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120  
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180  
ggacaccatc gcaaattccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240  
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300  
cgcgggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360  
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420  
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480  
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540  
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600  
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660  
ccgaggttac gtctttctcc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720  
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780  
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa agggtgggcc 840  
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttcgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900  
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960  
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020  
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080  
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140  
tagacgcac cgaaacctcc accccactca cctagtccga catccgtacc ttggaaaccg 1200  
acctgtattg gcatttcagt tggacatcga ccagtggcgt tgctaggttc aagaccatgt 1260  
ccagcccga ggcgtccaga ctctagccac cggaggtagt ccggtggcca catcccgtcg 1320

cgccgaacg tcacgtcttt gtgtggcctt cccttgttgt ttgcgatcag tggcacacct 1380  
ctaccgtctg aatttcgagt ctggcctcgg ctgcgcacat ctcgactgt gacgctgtca 1440  
ggtcacccgc ttgcgggcta ccagttcctt tcatcgaatc gagcttccgg tgccgccgcg 1500  
cagcctccct gaccatcctc agattttatg gagtctcgca gtgcctttcg ctatctacgt 1560  
cctcgggctt gctgtcttcg cccagggcac atccgagttc atgttgtccg gactcatacc 1620  
ggacatggcc cgtgacctcg gggtttcggg ccccgccgcc ggactcctca cctccgcctt 1680  
cgcggtcggg atgatcatcg gcgtccggtt gatggctatc gccagcatgc ggtggccccg 1740  
gcgacgcgcc cttctgacat tcctcatcac gticatgtg gtccacgtca tcggcgcgct 1800  
caccagcagc ttcgaggctt tgctggtcac acgcatcgtg ggagccctcg ccaatgccgg 1860  
attcttggca gtggccctgg gggcggcgat ggcatgggtg cccgccgaca tgaaagggcg 1920  
cgccacgtcc gtctcctcg gcggtgtcac gatcgcatgt gtagccggtg ttcccggggg 1980  
cgcttcctg ggtgaaatgt ggggctggcg tgcagcgttc tgggtgtcg tcgtcatctc 2040  
cgcccctgca gtggtggcga ttatgttcgc caccgccgcc gagccgcttg cagagtccac 2100  
accgaatgcc aagcgtgaac tgtctcact gcgtcacgc aagctccagc tcatgcttgt 2160  
cctcggggcg ctgatcaacg gcgcaacgtt ctgttcgttc acgtacatgg cgccacgct 2220  
caccgacatc tccggtttcg actcccgttg gattccgttg ctgctggggc tgttcgggct 2280  
cggatcgttc atcgggtgtca gcgtcggagg caggctcgcc gacaccggc cgttccaact 2340  
gtcgtgtgtc ggggtccgag cactgttgac gggatggatc gtcttcgtc tcacggcatc 2400  
ccaccccgcg gtgacattgg tgatgctgtt cgtgcagggc gctttgtcct tcgcggtcgg 2460  
ctcgactttg atctcccagg tgctctacgc cgccgacgcg gcaccgacct tgggtggatc 2520  
gttcgcgacg gccgcgttca acgtcgggtc tgcactggga ccggcgctcg gcgggttggc 2580  
gatcggcatg ggtctgagct accgcgcccc gctctggacg agcgccgcgc tggtagact 2640  
cgcgatcgtc atcggcgag ccacctgtc tctgtggcgg cgaccagcgt ctgtccacga 2700  
atctgtcccc gcctgaccag aaaccaggat ctgtgagtgt ggtgactgat ctgtgcacgc 2760  
tcagcagtca ccgcgcgtc gcgtcgtacc gagggccagc gccaacaggt gtgtggagct 2820  
ctgcccctgc ctctttcacg cgaactcact gticagtgcg gcgatacgtg ctcggtgagt 2880  
tccactacag cgacatgac tagaattgat ctctcgacc gccaatggg catctgagaa 2940  
tcatctgcgt ttctgcacg caacgtactt gcaacgttgc aactcctagt gttgtgaatc 3000  
acacccacc ggggggtggg attgcagtca ccgatttggg ggggtgcgcc aggaagatca 3060

cgtttacata ggagcttgca atgagctact ccgtgggaca ggtggccggc ttcgccggag 3120  
tgacgggtgcg cacgctgcac cactacgacg acatcggcct gctcgtaccg agcgagcgca 3180  
gccacgcggg ccaccggcgc tacagcgacg ccgacctga ccggctgcag cagatcctgt 3240  
tctaccggga gctgggcttc ccgctcgacg aggtcgccgc cctgctcgac gaccggccg 3300  
cggacccgcg cgcgcacctg cgccgccagc acgagctgct gtccgcccgg atcgggaaac 3360  
tgcagaagat ggcgggcgcc gtggagcagg cgatggaggc acgcagcatg ggaatcaacc 3420  
tcaccccgga ggagaagttc gaggtcttcg gcgacttcga ccccgaccag tacgaggagg 3480  
aggtccggga acgctggggg aacaccgacg cctaccgcca gtccaaggag aagaccgcct 3540  
cgtacaccaa ggaggactgg cagcgcatcc aggacgaggc cgacgagctc acccggcgt 3600  
tcgtcgccct gatggacgcg ggtgagcccg ccgactccga gggggcgatg gacgccgccg 3660  
aggaccaccg gcagggcatc gcccgaacc actacgactg cgggtacgag atgcacacct 3720  
gcctgggcca gatgtactg tccgacgaac gtttcacgcg aaacatcgac gccgccaagc 3780  
cgggcctcgc cgctacatg cgcgacgca tcctcgcca cgccgtccgg cacacccct 3840  
gagcggtggt cgtggcccgg gtctcccgcc cggctcacc ccacggctca ctccgggccc 3900  
acgaccaccg ccgtcccgta cgcgcacacc tcggtgcca cgtccgccgc ctccgtcacg 3960  
tcgaaacgga agatccccgg gtaccgagct cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc 4020  
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 4080  
aataaccctg ataatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 4140  
tccgtgtcgc cttattccc ttttttgcg cttttgcct tcctgtttt gctcaccag 4200  
aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg gggtacatcg 4260  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa 4320  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atccgtatt gacgccgggc 4380  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag 4440  
tcacagaaaa gcatttacc gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 4500  
ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc 4560  
taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt tgggaaccgg 4620  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 4680  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttccgg caacaattaa 4740  
tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccattct gcgctcgcc cttccggctg 4800



gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag 4860  
cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg 4920  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 4980  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt 5040  
aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac 5100  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 5160  
atcctttttt tctgcgcgta atctgtgct tgcaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 5220  
tggtttgttt gccgatcaa gagctacaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5280  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5340  
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagt gctgctgcca 5400  
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5460  
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 5520  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa 5580  
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 5640  
cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5700  
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5760  
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5820  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 5880  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 5940  
aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac tagagtcccg 6000  
ctgaggcggc gtagcaggtc agccgcccc gcggtggtca ccaaccgggg tggaacggcg 6060  
ccggtatcgg gtgtgtccgt ggcgtcatt ccaacctcg tgtgtttgtg caggtttcgc 6120  
gtgttgagcgt ccctcgacc ggcacccgca gcgaggggct cacgggtgcc ggtgggtcga 6180  
ctagttcagt gatggtgatg gtgatgctcg agagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 6240  
cgtagaattc ccatggcgtg atggtgatgg tgatggccca tatgtatac tccttcttaa 6300  
agttaaacia aattatttct agacgccgtc cacgtgcct cctcacgtga cgtgaggtgc 6360  
aagcccggac gttccgcgtg ccacgccgtg agccgccgcg tgccgtcggc tccctcagcc 6420  
cgggcccggc tgggagccc cctcgatatg tacaagcatg gggactcgcc gcggactagc 6480  
ggcttcccga cacgccgtac tgaccagcag atcagcgata aacgctgttt ctgctggtta 6540

agtggataaa aaccaaataa tcgatgaacc tcgaagtgga gtatccgagc tgaactagct 6600  
ggatttactc cgaaaatacg agcggcgacg aagggtgttg gaccaccctg ccgccgcctt 6660  
cgaggctcct acttgactag gaccccgctc gttatgacca gcgtaagtgc tgaacacctt 6720  
tccggcaaag accggccccc tgtcctcgtg tcgtccgata agcgcggcat ccggcacgaa 6780  
cttcgacca aacttcaaca aatcaccacg tcagaaactt ttaatgcgtg cggccggccg 6840  
atttccggcg tgaacgggtg gaccatcgtc aacgggtcca aaggttccgg atttggaggc 6900  
cttcgctcct gcggaaaggg ctggatctgc ccctgctgtg cgggaaaagt cggcgcacat 6960  
cgagcagacg aaatttctca agttgttgct catcaactcg ggactggatc tgttgcgatg 7020  
gtgaccatga ccatgcgcca taccgctggg cagcgtttgc atgatttgtg gactggactt 7080  
tcggcagcct ggaaagctgc gaccaatggc cgccgatggc gtaccgaacg tgaaatgtac 7140  
ggctgcgacg gatacgtacg agctgttgaa atcactcacg gaaaaaacgg ttggcacgtt 7200  
cacgtccacg ctctactcat gttcagcggg gacgtgagtg agaacatcct cgaatccttc 7260  
tcggatgcga tgttcgatcg gtggacctcc aaactcgtgt ctctgggatt tgctgcgcca 7320  
ctacgtaatt caggtggact cgacgtaaga aagattggtg gagaagctga ccaagttctc 7380  
gctgcatacc tgacgaaaat tgcattccggg gtcggcatgg aagtcggcag tggcgacgga 7440  
aaaagtggtc ggcacggcaa ccgtgcacct tgggaaatcg ccgttgatgc agtcggagga 7500  
gatccacaag cgttggaact ctggcgcgag tttgagttcg gttcgatggg acgccgagca 7560  
atcgcattgt ctcgtggact gcgcgcccga gctggtcttg gcgtagaact cacggatgct 7620  
cagattgtcg aacaggaaga atctgccccg gtcattggtg cgatcattcc ggctcgggtc 7680  
tggtatgatga ttcggaactg tgcgccttac gttttcggag agatccttgg actcgtggaa 7740  
gcgggcgcga cctgggaaaa ccttcgtgac cacttgcatt atcgattgcc tgcagcggat 7800  
gtgcggcctc cgataatatc gattcgtaag tgaaatgtct tgggtgtgcaa caactttcac 7860  
tcgtatgaac cacatttgag ggcattcccc cgatacttgc cgctttgaag ctgggtgtct 7920  
ctctgtcagg gctgcgatag caccgcgtag cggcttggcc ttgacagaga gacggcctgt 7980  
ttcatgggtg gtctcggggg gctgaccggg cagatagaaa aaggccggcc gatttggctg 8040  
ccgactatit ttgcaggtaa acccatctca tgagcatcaa tgaacgtccc gttggtatcg 8100  
cagcgaatgc agcttcggta gacgtcgatg gcgttgtgat ggggtgtgat ctctcgcttt 8160  
atgggcaaga aatcacgcta gatcgagatg atgcgttcct actcctcgat cgacttcagg 8220  
acgcgttgcg acctcaagcc aactaagaac cctccagatg gtctaaacga ggcgcaaact 8280

cgctcctggg cctgcgggcg gaggaccgaa gcgcgagcga agcggagcgc gtaggtgggg 8340  
gagcctgcgg gcagcggcgg cggagccgcc gccttggtaa taggtgatca tcggggccat 8400  
agcaggtcag aggatgtttt tacgatgact catgctcacc acgccaagta ctgatg 8456

<210> 99

<211> 5984

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QT1

<400> 99

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
ccccggagcc tgcatggggc attccgccgt gaaccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
ctttccagca aagatcacct ggcgccgatg agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180  
gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgct catcgatc ctcggcaccg tcaccctgga 240  
tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg atatcgtcca 300  
ttccgacagc atgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt tgatgcaatt 360  
tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgccgcc cagtcctgct 420  
cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacagggt cggttgcttg 540  
cgcttatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
cgcttgtttc ggctgggta tgggtggcagg ccccgtaggc gggggactgt tgggcgccat 660  
ctccttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc tactactggg 720  
ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgctgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
caaccagtc agtccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 840  
tgtcttctt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900

cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgccg tattcggaat 960  
cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgttcgc 1080  
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcatcgggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200  
aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttcgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag gcgccgccct 1320  
ataccttgtc tgctccccg cgttgcgctc cgggtcatgg agccgggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggcggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatata catcgcgctc 1500  
gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggtac cgagctcgtc aggtggcact tttcggggaa 1620  
atgtgcgcg aaccctatt tgtttatitt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740  
aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 1800  
accagaaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccaatgat gagcactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980  
ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actatttctc gaatgacttg gttgagtact 2040  
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg 2100  
ccataacatc gagtataac actgcggcca acttacttct gacaacgacg ggaggaccga 2160  
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcgttggg 2220  
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 2340  
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2460  
ttgcagcact ggggcccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta 2580  
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640

atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt 2760  
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac 2820  
cagcgggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct 2880  
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940  
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg gggttgactc aagacgatag ttaccggata 3060  
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3120  
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3240  
agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 3300  
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
acgggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3420  
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc 3480  
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagactaga 3600  
gtcccgtga ggcggcgtag caggtcagcc gcccagcgg ttggtaccaa ccgggggtgga 3660  
acggcgccgg tatcgggtgt gtccgtggcg ctattccaa cctccgtgtg tttgtgcagg 3720  
tttcgcgtgt tgcatcct cgcaccggca cccgcagca ggggctcacg ggtgccggtg 3780  
ggtcgactag ttcagtgatg gtgatgggtg tgctcgagag atctaagctt ggatccgcgg 3840  
ccgctacgta gaattcccat atgggtgatg tgatgggtggc ccatggtata tctccttctt 3900  
aaagttaaac aaaattattt ctagacgccg tccattatac ctctcacgt gacgtgaggt 3960  
gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg gtcctcag 4020  
cccggggcgc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacaccgc agaagctccc agcgtcctcc 4080  
tgggcccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgact aacgattcgg ccggcgctcg 4140  
attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccggcg 4200  
ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct ctgcgcgccg 4260  
taccgacct acctccgca gctcgaagca gctcccgga gtaccgccgt actacccgc 4320  
ctgtgctcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc accaaggtgc 4380

cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag cgcggcaagg 4440  
ttcaaaaagc aggggttggg ggggaggagg ttttgggggg tgctgccggg atacctgata 4500  
tggctttgtt ttgcgtagtc gaataatitt ccatatagcc tcggcgcgtc ggactcgaat 4560  
agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg tgctgagcga 4620  
tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga acaacctcca 4680  
acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcattggca atgcggtacg tcgagcattc 4740  
accgcacgcg ttgctcgat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg ccgcgatgcg 4800  
cgatttcgag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat cgccgtccgg 4860  
ccgcgcacac atcggatggg ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg acagcgcccg 4920  
actgacgcca ctgcgctacg cccaccgcat cgaaaccggc ctcaagatca gcgtcggcgg 4980  
cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaacccgatt caccgatt gggagacgat 5040  
ctacggcccg gccaccccg acacattgcg gcagctggcc accatccaca caccgga 5100  
gatgccgcgt cggcccgatc gggccgtggg cctgggcccgc aacgtcacca tgttcgacgc 5160  
caccgga tgggcatacc cgcagtggg gcaacaccga aacggaaccg gccgcgactg 5220  
ggaccatctc gtctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga caccactgcc 5280  
gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc gcaatttcac 5340  
cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcgggtcaa aaaggcggca aggcaacgac 5400  
actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac atacgatgcg 5460  
agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat gacggcagca 5520  
gcagcagccg aaaaattcgg tgccctccact cgcacaatcc aacgcttgtt tgctgagccg 5580  
cgtgacgatt acctcggccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga gctgcggaag 5640  
caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg gatcgtcggc 5700  
cgattactgc acgacgccc caggcacggc gagatttcag cggaggatct gtcggcgtaa 5760  
ccaagtcagc gggttgcg gttccggccg gcgctcggca ctcggaccgg ccggcgatg 5820  
gtgttctgcc tctggcgag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga ccggcttcga 5880  
ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgt cgaccgctac 5940  
ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctc 5984

<210> 100

<211> 5988

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QT2

<400> 100

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
ccccggagcc tgcattggggc attccgccgt gaaccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
ctttccagca aagatcacct ggcgccgatg agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180  
gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgct catcgatcatc ctccggcaccg tcaccctgga 240  
tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgccggg atatcgatcca 300  
ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt tgatgcaatt 360  
tctatgcgca ccgcttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgccgcc cagtcctgct 420  
cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacagggt cggttgctgg 540  
cgcttatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
cgcttgcttc ggcttgggta tgggtggcagg cccgtggcc gggggactgt tgggcgcat 660  
ctccttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggcctcaacc tactactggg 720  
ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
caaccagtc agtccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 840  
tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900  
cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgccg tattcggaat 960  
cttgacgcc ctgcgtcaag ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc tggcgcttgc 1080  
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg gcatcgggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200

aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttcgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag gcgccgccct 1320  
ataccttgtc tgcctccccg cgttgctgcg cgggtgatgg agccggggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggcggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatata catcgcgctc 1500  
gccatctcca gcagccgcac gcggcgcata tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggtac cgagctcgtc aggtggcact tttcggggaa 1620  
atgtgcgagg aacccttatt tgtttatatt tctaaatata ttcaaataatg tatccgctca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740  
aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 1800  
accagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccaatgat gagcactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980  
ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2040  
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg 2100  
ccataacat gatgataac actgcggcca acttacttct gacaacgata ggaggaccga 2160  
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcggtggg 2220  
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 2340  
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2460  
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc tctactgatta 2580  
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640  
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt 2760  
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac 2820  
cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcgaag gtaactggct 2880  
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940



tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata 3060  
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3120  
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3240  
agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 3300  
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttttttctg 3420  
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 3480  
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgactaga 3600  
gtccccgtga ggccggcgtag caggtcagcc gccccagcgg tggtcaccaa ccgggggtgga 3660  
acggcgcccg tatcgggtgt gtccgtggcg ctcatccaa cctccgtgtg tttgtgcagg 3720  
tttcgcgtgt tgcagtccct cgcaccggca cccgcagcga ggggctcacg ggtgccggtg 3780  
ggtcgactag ttcagtgatg gtgatggtga tgctcgagag atctaagctt ggatccgcgg 3840  
ccgctacgta gaattcccat ggcgtgatgg tgatggtgat ggcccatatg tatatctcct 3900  
tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagac gccgtccatt atacctctc acgtgacgtg 3960  
aggtgcaagc ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc 4020  
tcagcccggg cggccgtggg agcccgctc gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc 4080  
ctcctgggcc gcgatactcg accaccacgc acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg 4140  
ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc 4200  
ggcgctcgat tcggccgagc agaagagtga acaaccaccg accacgcttc cgctctgcgc 4260  
gccgtaccg acctacctc cgcagctcga agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac 4320  
ccgcctgtgc tcaccatcca ccgacgcaa gcccaaccg agcacacctc ttgcaccaag 4380  
gtgccgaccg tggctttccg ctcgcagggt tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc 4440  
aaggttcaaa aagcaggggt tgggtggggag gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct 4500  
gatatggctt tgttttgcgt agtcgaataa ttttccatat agcctcggcg cgtcggactc 4560  
gaatagttga tgtgggcggg cacagttgcc ccatgaaatc cgcaacgggg ggcgtgctga 4620  
gcgatcggca atgggcggat gcggtgttgc ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc 4680

tccaacgagg tcagtaccgg atgagccgcg acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc 4740  
attcaccgca cgcgttgctc ggatctatcg tcatcgactg cgatcacgtt gacgccgcga 4800  
tgcgcgcatt cgagcaacca tccgaccatc cggcgccgaa ctgggtcgca caatcgccgt 4860  
ccggccgcgc acacatcgga tgggtggctcg gcccacaacca cgtgtgccgc accgacagcg 4920  
cccgactgac gccactgcgc tacgcccacc gcatcgaaac cggcctcaag atcagcgctc 4980  
gcggcgattt cgcgtatggc gggcaactga ccaaaaaccc gattcacccc gattgggaga 5040  
cgatctacgg cccggccacc ccgtacacat tgcggcagct ggccaccatc cacacacccc 5100  
ggcagatgcc gcgtcggccc gatcggggccg tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg 5160  
acgccacccg gcgatgggca taccgcagct ggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg 5220  
actgggacca tctcgtcctg cagcactgcc acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac 5280  
tgccgttcac cgaagtacgc gccaccgcgc aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt 5340  
tcaccgaaga acagtaccga gcccgacaag cgcattctcg tcaaaaaggc ggcaaggcaa 5400  
cgacactcgc caaacaagaa gccgtccgaa acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga 5460  
tgcgagaggc gattatctga tgggcggagc caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc 5520  
agcagcagca gccgaaaaat tcggtgcctc cactcgcaca atccaacgtt tgtttgctga 5580  
gccgcgtgac gattacctcg gccgtgcgaa agctcgccgt gacaaagctg tcgagctcgc 5640  
gaagcagggg ttgaagtacc gggaaatcgc cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt 5700  
cggccgatta ctgcacgacg cccgcaggca cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc 5760  
gtaaccaagt cagcgggttg tcgggttccg gccggcgctc ggcaactcgga ccggccggcg 5820  
gatggtgttc tgcctctggc gcagcgtcag ctaccgccga aggcctgtca tcgaccggct 5880  
tcgactgaag tatgagcaac gtcacagcct gtgattggat gatcggctca cgctcgaccg 5940  
ctacctgttc agctgccgcc cgctgggcat gagcaacggc caactctc 5988

<210> 101

<211> 6058

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:vector pNit-RT1

&lt;400&gt; 101

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
ccccggagcc tgcattggggc attccgccgt gaacccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
ctttccagca aagatcacct ggccgccgat agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180  
gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgt catcgtcatc ctccggaccg tcacctgga 240  
tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg atatcgtcca 300  
ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgctg tgatgcaatt 360  
tctatgcgca ccgcttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgccgcc cagtcctgct 420  
cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacagggt cggttgcctg 540  
cgctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
cgcttgcttc ggccgtgggtg ttgtggcagg ccccgctggc gggggactgt tgggcgccat 660  
ctccttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggccctcaacc tactactggg 720  
ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
caaccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 840  
tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900  
cgaggaccgc tttcgttga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg tattcggaat 960  
cttgacgccc ctgctcaag ccttcgtcac ttgtcccgcc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgtgggc tacgtcttgc tggcgcttgc 1080  
gacgcgagggc ttgatggcct tccccattat gattcttctc gcttccggcg gcatcgggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200  
aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag gcgccgccct 1320  
ataccttgtc tgcttccccg cgttgcgtcg cgggtgatgg agccgggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggcggcacct cgctaacgga ttaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatatc catcgcgtcc 1500

gccatctcca gcagccgcac gcggcgcac tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggtac cgagctcgtc aggtggcact tttcggggaa 1620  
atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatatt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740  
aacatttccg tgctgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc 1800  
accagaaac gctgggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccaatgat gaggactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980  
ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2040  
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg 2100  
ccataaccat gaggatgatac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 2160  
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg 2220  
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 2340  
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2460  
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga gataggtgcc tctactgatta 2580  
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640  
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
cttaacgtga gttttcgtc cactgagcgt cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt 2760  
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac 2820  
cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct 2880  
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940  
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggtact aagacgatag ttaccggata 3060  
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 3120  
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgacagagg 3240

agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 3300  
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
acgcggcctt ttacggttc ctggccttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3420  
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc 3480  
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagactaga 3600  
gtcccgctga ggcggcgtag caggtcagcc gcccagcgg tggtcaccaa ccgggggtgga 3660  
acggcgccgg tatcggtgt gtccgtggcg ctcatccaa cctccgtgtg ttgtgcagg 3720  
tttcgctgtg tgcagtcct cgcaccggca cccgcagca ggggctcacg ggtgccggtg 3780  
ggtcgactag ttcaagtgt gtgatgtga tgctcagag atctaagctt ggatccgcgg 3840  
ccgtacgta gaattcccat atggtgatgg tgatgggtgc ccatggtata tctcttctt 3900  
aaagttaaac aaaattattt ctagacgccg tccattatac ctctcacgt gacgtgaggt 3960  
gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg gctccctcag 4020  
cccgggcggc cgtgggagcc cgctcgata tgtacaagca tggggactcg ccgcggacta 4080  
gcggttccc gacacgccgt actgaccagc agatcagca taaacgctgt ttctgctggt 4140  
taagtggata aaaaccaa atcgaatga cctcgaagt gagtatccga gctgaactag 4200  
ctggatttac tccgaaaata cgagcggcga cgaagggtgt tggaccacc tgccgccgc 4260  
ttcaggctc ctacttgact aggacccgc tcgttatgac cagcgtagt gctgaacacc 4320  
tttcggcaa agaccggccc cctgtcctcg tgctgtccga taagcgcggc atccggcacg 4380  
aacttcgacc caaacttcaa caaatcacca cgtcagaaac ttttaatgcg tgcggccggc 4440  
cgatttccgg cgtgaacggt gtgaccatcg tcaacggtcc caaagggtcc ggatttggag 4500  
gccttcgctc ctgcggaaag ggctggatct gccctgctg tgcgggaaaa gtcggcgcac 4560  
atcgagcaga cgaaatttct caagtgttg ctcatcaact cgggactgga tctgttgcga 4620  
tggtgaccat gaccatgcgc cataccgtg ggcagcgtt gcatgattg tggactggac 4680  
tttcggcagc ctggaagct gcgaccaatg gccgccgat gcgtaccgaa cgtgaaatgt 4740  
acggctgcga cggatacgt cgagctgttg aaatcactca cgaaaaaac ggttggcacg 4800  
ttcacgtcca cgctctact atgttcagcg gtgacgtgag tgagaacatc ctggaatcct 4860  
tctcgatgc gatgttcgat cgggtggacct ccaaactcgt gtctctggga ttgtgcgc 4920  
cactacgtaa ttcaggtgga ctgcagtaa gaaagattg tggagaagct gaccaagttc 4980

tcgctgcata cctgacgaaa attgcatccg gggctcgcat ggaagtcggc agtggcgacg 5040  
gaaaaagtgg tcggcacggc aaccgtgcac cttgggaaat cgccgttgat gcagtcggag 5100  
gagatccaca agcgttgga cttctggcgcg agtttgagtt cggttcgatg ggacgccgag 5160  
caatcgcatg gtctcgtgga ctgcgcgccc gagctggctt tggcgtagaa ctcacggatg 5220  
ctcagattgt cgaacaggaa gaatctgccc cggctcatggt tgcgatcatt ccggctcgg 5280  
cctggatgat gattcggaac tgtgcgcctt acgttttcgg agagatcctt ggactcgtgg 5340  
aagcgggccc gacctgggaa aaccttcgtg accacttgca ttatcgattg cctgcagcgg 5400  
atgtgcggcc tccgataata tcgattcgta agtgaaatgt cttggtgtgc aacaactttc 5460  
actcgtatga accacacttg agggcatccc cccgatactt gccgctttga agctgggtgt 5520  
ctctctgtca gggctgcgat agcaccgcgt agcggcttgg ccttgacaga gagacggcct 5580  
gtttcatggt tggctcggg gggctgaccg ggcagataga aaaaggccgg ccgatttggc 5640  
tgccgactat ttttgaggt aaacccatct catgagcatc aatgaacgtc ccgttggtat 5700  
cgcagcgaat gcagcttcgg tagacgtcga tggcgttgtg atgggtgtgt atctctcgct 5760  
ttatgggcaa gaaatcacgc tagatcgaga tgatgcgttc ctactcctcg atcgacttca 5820  
ggacgcgttg cgacctcaag ccaactaaga accctccaga tggctctaac gaggcgcaaa 5880  
ctcgtcctg ggcctgcggg cggagcaccg aagcgcgagc gaagcggagc gcgtaggtgg 5940  
gggagcctgc gggcagcggc ggcggagccg ccgccttgggt aataggtgat catcggggcc 6000  
atagcaggtc agaggatgtt ttacgatga ctcatgctca ccacgccaag tactgatg 6058

<210> 102

<211> 6062

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-RT2

<400> 102

gttaactaga gtaacgggct actccgttta acggaccccg ttctcacgct ttaggcttga 60  
ccccggagcc tgcattggggc attccgccgt gaaccgggtg gaatgcccc ggcacccggg 120  
ctttccagca aagatcacct ggccgccgatg agtaaggcgt acagaaccac tccacaggag 180  
gaccgtcgag atgaaatcta acaatgcgct catcgatcat ctcggcaccg tcaccctgga 240  
tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg atatcgcca 300  
ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt tgatgcaatt 360  
tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgccgcc cagtcctgct 420  
cgcttcgcta cttggagcca ctatgacta cgcgatcatg gcgaccacac ccgtcctgtg 480  
gattctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacagggt cggttgctgg 540  
cgcctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg ggctcatgag 600  
cgcttgcttc ggctgggta tggtagcagg ccccgtaggc gggggactgt tgggcgccat 660  
ctccttgcat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac ggctcaacc tactactggg 720  
ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcgt ccgatgccct tgagagcctt 780  
caaccagtc agtccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg cacttatgac 840  
tgtcttctt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg tcattttcgg 900  
cgaggaccgc ttctgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg tattcggaat 960  
cttgacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tggctccgcc accaaacgtt tcggcgagaa 1020  
gcaggccatt atcgccggca tggcgccga gcgctgggc tacgtcttgc tggcgctgc 1080  
gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttccggcg gcatcgggat 1140  
gcccgcgttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg gacagcttca 1200  
aggatcgctc gggctctta ccagcctaac ttgatcatt ggaccgctga tcgtcacggc 1260  
gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggatttag gcgccccct 1320  
ataccttgct tgctccccg cgttgcgtcg cggatcatgg agccgggcca cctcgacctg 1380  
aatggaagcc ggccggcacct cgctaacgga ttaccactc caagaattgg agccaatcaa 1440  
ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatct catcgctcc 1500  
gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg gccacgggtg 1560  
cgcatgatcg tgctcctgtc gttgaggtag cgagctcgtc aggtggcact ttccggggaa 1620  
atgtgcgcg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca 1680  
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1740

aacattttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 1800  
accagaaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1860  
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 1920  
ttccaatgat gagcactttt aaagtcttgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg 1980  
ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2040  
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg 2100  
ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgacg ggaggaccga 2160  
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgccctt gatcgttggg 2220  
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 2280  
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 2340  
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2400  
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2460  
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga 2520  
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta 2580  
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 2640  
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 2700  
cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt 2760  
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac 2820  
cagcgggtggg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct 2880  
tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 2940  
tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 3000  
ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata 3060  
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga 3120  
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag 3180  
ggagaaaggc ggacaggat cccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 3240  
agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 3300  
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca 3360  
acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 3420  
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 3480



gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa 3540  
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgactaga 3600  
gtccccgtga ggcggcgtag caggtcagcc gccccagcgg tggtcaccaa ccgggggtgga 3660  
acggcgcccg tatcgggtgt gtccgtggcg ctcatccaa cctccgtgtg tttgtgcagg 3720  
tttcgcgtgt tgcagtcctt cgcaccggca cccgcagcga ggggctcacg ggtgccggtg 3780  
ggtcgactag ttcagtgatg gtgatggatg tgctcgagag atctaagctt ggatccgcgg 3840  
ccgctacgta gaattcccat ggctgatgg tgatggatg ggcccatatg tatactctct 3900  
tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagac gccgtccatt atacctctc acgtgacgtg 3960  
aggtgcaagc ccggacgttc cgcgtgccac gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc 4020  
tcagcccggg cggccgtggg agcccgctc gatatgtaca agcatgggga ctgccgcgg 4080  
actagcggct tcccgacacg ccgtactgac cagcagatca gcgataaacg ctgtttctgc 4140  
tggttaagtg gataaaaacc aaataatcga tgaacctcga agtggagtat ccgagctgaa 4200  
ctagctggat ttactccgaa aatacagcgc gcgacgaagg gtgttgacc accctgccgc 4260  
cgcttcgag gctcctactt gactaggacc ccgtcgtta tgaccagcgt aagtgtgaa 4320  
cacctttccg gcaaagaccg gccccctgtc ctctgtctgt ccgataagcg cggcatccgg 4380  
cacgaacttc gacccaaact tcaacaaatc accacgtcag aaacttttaa tgcgtgcggc 4440  
cggccgattt ccggcgtgaa cgggtgtgacc atcgtcaacg gtcccaaagg ttccggattt 4500  
ggaggccttc gctcctgcgg aaagggtgg atctgccct gctgtgcggg aaaagtcggc 4560  
gcacatcgag cagacgaaat ttctcaagtt gttgctcctc aactcgggac tggatctgtt 4620  
gcgatggtga ccatgaccat gcgccatacc gctgggcagc gtttgcata tttgtggact 4680  
ggactttcgg cagcctggaa agctgcgacc aatggccgcc gatggcgtag cgaacgtgaa 4740  
atgtacggct gcgacggata cgtacgagct gttgaaatca ctacaggaaa aaacggttgg 4800  
cacgttcag tccacgtctt actcatgtt agcggtgacg tgagtgagaa catcctcgaa 4860  
tccttctcgg atgcgatgtt cgatcgggtg acctccaaac tcgtgtctct gggatttgct 4920  
gcgccactac gtaattcagg tggactcgac gtaagaaaga ttgggtggaga agctgaccaa 4980  
gttctcgtg catacctgac gaaaattgca tccggggctc gcatggaagt cggcagtggc 5040  
gacggaaaaa gtggtcggca cggcaaccgt gcaccttggg aaatcgccgt tgatgcagtc 5100  
ggaggagatc cacaagcgtt ggaactctgg cgcgagttt agttcggttc gatgggacgc 5160  
cgagcaatcg catggtctcg tggactgcgc gcccgagctg gtcttggcgt agaactcacg 5220

gatgctcaga ttgtcgaaca ggaagaatct gccccgtca tggttgcgat cattccggct 5280  
cggtcctgga tgatgattcg gaactgtgcg ccttacgttt tcggagagat ccttggactc 5340  
gtggaagcgg gcgcgacctg ggaaaacctt cgtgaccact tgcattatcg attgcctgca 5400  
gcggatgtgc ggcctccgat aatatcgatt cgtaagtga atgtcttgggt gtgcaacaac 5460  
tttactcgt atgaaccaca cttgagggca tcccccgat acttgccgct ttgaagctgg 5520  
gtgtctctct gtcagggtcg cgatagcacc gcgtagcggc ttggccttga cagagagacg 5580  
gcctgtttca tggttggtct cggggggctg accgggcaga tagaaaaagg ccggccgatt 5640  
tggctgccga ctatTTTTgc aggtaaaccc atctcatgag catcaatgaa cgtcccgttg 5700  
gtatcgcagc gaatgcagct tcggtagacg tcgatggcgt tgtgatgggt gtgtatctct 5760  
cgctttatgg gcaagaaatc acgctagatc gagatgatgc gttcctactc ctcgatcgac 5820  
ttcaggacgc gttgcgacct caagccaact aagaaccctc cagatgggtct aaacgaggcg 5880  
caaactcgct cctgggcctg cgggcgggagc accgaagcgc gagcgaagcg gagcgcgtag 5940  
gtgggggagc ctgcgggcag cggcggcgga gccgccgcct tggtaatagg tgatcatcgg 6000  
ggccatagca ggtcagagga tgTTTTtacg atgactcatg ctcaccacgc caagtactga 6060  
tg 6062

<210> 103

<211> 6153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QC1

<400> 103

gttaacgcat ccgaaacctc caccacctc acctagtccg acatccgtac cttggaaacc 60  
gacctgtatt ggcatttcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120  
tccagcccga aggcgccag actctagcca ccggaggtag tccggtggcc acatcccgtc 180

gcgcccgaac gtcacgtctt tgtgtggcct tcccttgttg tttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgtgtc 300  
aggtcaccg cttcgcggt accagttcct ttcacgaat cgagcttccg gtgccgccg 360  
gcagcctccc tgaccatcct cagattttat ggagtctcgc agtgcctttc gctatctacg 420  
tcctcgggct tgctgtcttc gccaggggca catccgagtt catgttgtcc ggactcatac 480  
cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgccgc cggactcctc acctccgct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgctccgt tgatggctat cgccagcatg cgggtggcccc 600  
ggcgacgcgc cttctgaca ttcctcatca cgttcacgtt ggtccacgtc atcggcgcg 660  
tcaccagcag cttcgaggtc ttgctgggtca cacgcacgtt gggagccctc gccaatgccg 720  
gattcttggc agtggccctg ggggcgggca tggcgatggt gcccgccgac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtcctctc ggcggtgtca cgatcgcatg ttagccggt gttcccgggg 840  
gcgccttctt gggtgaaatg tggggctggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtgggtggcg attatgttcg ccaccccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtcctcac tgcgtcacg caagctccag ctcatgcttg 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgcccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggtttc gactcccgtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140  
tcggatcgtt catcggtgtc agcgtcggag gcaggctcgc cgacaccgg ccgttccaac 1200  
tgctcgtgt cggttcgca gcaactgtga cgggatggat cgtcttcgct ctcacggcat 1260  
cccacccgc ggtgacattg gtgatgtgt tctgacagg cgctttgtcc ttcgcggctg 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgtctacg ccgccgacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgttcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgcaactgg accggcgctc ggcgggttgg 1440  
cgatcggcat ggggtctgagc taccgcgcc cgctctggac gagcgccgc ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccacctgt ctctgtggcg gcgaccagcg tctgtccacg 1560  
aatctgtccc cgcctgacca gaaaccagga tctgtgagtg tggtgactga tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgt cgcgtcgtac cgagggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tgttcagtgc ggcgatacgt gctcgggtgag 1740  
ttccactaca gcgaggtacc gagctcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
accctattt gttatTTTT ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 1920

gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttctg tttttgctca cccagaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 2040  
gatctcaaca gcggttaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220  
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg 2280  
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgcttg atcgttggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaagcga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520  
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2880  
tttctgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940  
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtgggtgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 3240  
tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360  
gacaggatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcgcccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt tctttctgc gttatcccct 3600  
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgagccga 3660

acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg 3720  
cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tcccgtgag 3780  
gcggcgtagc aggtcagccg cccagcggt ggtcaccaac cggggtggaa cggcgccggt 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcaggt ttcgctgtt 3900  
gcagtccctc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccggtgg gtcgactagt 3960  
tcagtgatgg tgatggtgat gctcgagaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aattcccata tggatgatgg gatgggtggc catggtatat ctcttctta aagttaaaca 4080  
aaattatttc tagacccgt ccattatacc tcctcacgtg acgtgaggtg caagcccga 4140  
cgttccgctg gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc 4200  
gtgggagccc gcctcgatat gtacaccga gaagctcca gcgtcctcct gggcccgcat 4260  
actcgaccac cacgcacga caccgacta acgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 4320  
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc 4380  
cgagcagaag agtgaacaac caccgaccac gcttcgctc tgcgcgccgt acccgacct 4440  
cctcccgcag ctcaagcag ctcccgggag taccgccga ctcaccgcc tgtgtcacc 4500  
atccaccgac gcaaagcca acccgagcac acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct 4560  
ttccgctcgc agggttccag aagaaatcga acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca 4620  
ggggttggtg gggaggaggt tttggggggt gtcgccggga tacctgatat ggctttgtt 4680  
tgcgtagtcg aataattttc catatagcct cggcgctcg gactcgaata gttgatgtgg 4740  
gcgggcacag ttgccccatg aaatccgcaa cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg 4800  
cggatgcggt gttgcttcg caccggccgt tcgcgacgaa caacctcaa cgaggtcagt 4860  
accgatgag cgcgacgac gcattggcaa tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgct 4920  
tgctcggatc tatgtcatc gactcgcac acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc 4980  
aaccatccga ccatccggcg ccgaactggg tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca 5040  
tcggatggtg gctcggcccc aaccacgtgt gccgcaccga cagcgcccga ctgacgccac 5100  
tgcgctacgc ccaccgcatc gaaaccggcc tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgct 5160  
atggcgggca actgacaaa aaccgattc acccgattg ggagacgatc tacggcccgg 5220  
ccaccccgta cacattgcgg cagctggcca ccatccacac acccgggcag atgccgcgtc 5280  
ggcccgatcg ggccgtgggc ctgggcccga acgtcaccat gttcgacgcc accggcgat 5340  
gggcataccc gcagtgggtg caacaccgaa acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg 5400

tcctgcagca ctgccacgcc gtcaacaccg agttcacgac accactgccg ttcaccgaag 5460  
tacgcgccac cgcgcaatcc atctccaaat ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt 5520  
accgagccccg acaagcgcac ctcgggtcaaa aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcccaaac 5580  
aagaagccgt ccgaaacaat gcaagaaagt acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta 5640  
tctgatgggc ggagccaaaa atccggtgcg ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga 5700  
aaaattcggg gcctccactc gcacaatcca acgcttggtt gctgagccgc gtgacgatta 5760  
cctcggccgt gcgaaagctc gccgtgacaa agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa 5820  
gtaccgggaa atcgccgaag cgatggaact ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca 5880  
cgacgcccgc aggcacggcg agatttcagc ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg 5940  
ggttgtcggg ttccggccgg cgctcggcac tcggaccggc cggcggtatg tgttctgcct 6000  
ctggcgcagc gtcagctacc gccgaaggcc tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga 6060  
gcaacgtcac agcctgtgat tggatgatcc gctcacgctc gaccgctacc tgttcagctg 6120  
ccgcccgtg ggcatgagca acggccaact ctc 6153

<210> 104

<211> 6157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-QC2

<400> 104

gttaacgcat ccgaaacctc caccaccactc acctagtccg acatccgtac cttggaaacc 60  
gacctgtatt ggcatttcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120  
tccagcccga aggcgtccag actctagcca ccggaggtag tccggtggcc acatcccgtc 180  
gcgcccgaac gtcacgtctt tgtgtggcct tcccttggtt tttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgtgtc 300

aggtcacccg cttcgcggct accagttcct ttcacgaat cgagcttccg gtgccgccgc 360  
gcagcctccc tgaccatcct cagattttat ggagtctcgc agtgcctttc gctatctacg 420  
tcctcgggct tgctgtcttc gcccagggca catccgagtt catgttgtcc ggactcatac 480  
cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgccgc cggactcctc acctccgcct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgctccgt tgatggctat cgccagcatg cgggtggcccc 600  
ggcgacgcgc ctttctgaca ttctcatca cgttcatgct ggtccacgtc atcggcgcg 660  
tcaccagcag cttcgaggtc ttgctgtca cacgcatcgt gggagccctc gccaatgccg 720  
gattcttggc agtggccctg ggggcggcga tggcgatggt gcccgccgac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtcctcctc ggcggtgtca cgatcgcatg ttagaccggt gttcccgggg 840  
gcgccttcct gggtgaaatg tggggctggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtgggtggc attatgttcg ccacccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtcctcac tgcgtcacg caagctccag ctcatgcttg 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggtttc gactcccgtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140  
tcggatcgtt catcggtgtc agcgtcggag gcaggctcgc cgacaccgg ccgttccaac 1200  
tgctcgtgt cggttcgca gcaactgtga cgggatggat cgtcttcgct ctcacggcat 1260  
cccacccgc ggtgacattg gtgatgtgt tcgtgcaggg cgctttgtcc ttcgcggtcg 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgctctacg ccgccgacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgttcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgactggg accggcgctc ggccgggttg 1440  
cgatcggcat ggggtctgagc taccgcgcc cgctctggac gagcgccgcg ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccacattgt ctctgtggcg gcgaccagcg tctgtccacg 1560  
aatctgtccc cgctgacca gaaaccagga tctgtgagtg tggtgactga tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgt cgcgtcgtac cgagggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tgttcagtgc ggcgatacgt gctcgggtgag 1740  
ttccactaca gcgaggtacc gagctcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
accctatatt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 1920  
gtcgcctta ttcccttttt tgcggcatit tgcccttcctg tttttgtca cccagaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 2040

gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220  
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg 2280  
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520  
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggcct cactgattaa gcattggtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2880  
tttctgtcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940  
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcg 3240  
tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360  
gacaggtatc cggtaaagcg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt tctttctgc gttatcccct 3600  
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga 3660  
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg 3720  
cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tcccgtgag 3780



gcggcgtagc aggtcagccg cccagcggt ggtcaccaac cggggtggaa cggcgccggt 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcaggt ttcgctgtt 3900  
gcagtccctc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccggtgg gtcgactagt 3960  
tcagtgatgg tgatggtgat gctcgagaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aattcccatg gcgtgatggt gatggtgatg gcccatatgt atatctcctt cttaaagtta 4080  
aacaaaatta tttctagacg ccgtccatta tacctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc 4140  
cggacgttcc gcgtgccacg ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc 4200  
ggcgtggga gcccgctcg atatgtacac ccgagaagct cccagcgctc tcctgggccc 4260  
cgatactcga ccaccacgca cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc 4320  
cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt 4380  
cggccgagca gaagagtga caaccaccga ccacgcttcc gctctgcgcg ccgtaccga 4440  
cctacctccc gcagctcgaa gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgcctgtgct 4500  
caccatccac cgacgcaaag cccaaccga gcacacctt tgcaccaagg tgccgaccgt 4560  
ggctttccgc tcgcagggtt ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcgga aggttcaaaa 4620  
agcaggggtt ggtggggagg aggttttggg ggggtgtgcc gggatactg atatggcttt 4680  
gttttgcgta gtcgaataat tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat 4740  
gtgggcgggc acagttgcc catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa 4800  
tgggcggatg cgggtgttgc tccgcaccgg ccgttcgca cgaacaacct ccaacgaggt 4860  
cagtaccgga tgagccgcga cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac 4920  
gcgttgctcg gatctatcgt catcgactgc gatcacgttg acgccgcgat gcgcgcttc 4980  
gagcaaccat ccgaccatcc ggcgccgaac tgggtcgcac aatcgccgtc cggccgcga 5040  
cacatcggat ggtggctcgg cccaaccac gtgtgccga ccgacagcg ccgactgacg 5100  
ccactgcgt acgcccaccg catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc 5160  
gcgtatggcg ggcaactgac caaaaaccg attcaccg attgggagac gatctacggc 5220  
ccggccacc cgtacacatt gcggcagctg gccaccatcc acacaccg gcagatgccg 5280  
cgtcggcccc atcgggcccgt gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccg 5340  
cgatgggcat accgcagtg gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggacat 5400  
ctcgtcctgc agcactgcca cgccgtcaac accgagtca cgacaccact gccgttcacc 5460  
gaagtacgcg ccaccgcga atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa 5520

cagtaccgag cccgacaagc gcatctcggg caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc 5580  
aaacaagaag ccgtccgaaa caatgcaaga aagtagcagc aacatacgat gcgagaggcg 5640  
attatctgat gggcggagcc aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag 5700  
ccgaaaaatt cggcgcctcc actcgcacaa tccaacgctt gtttgctgag ccgcgtgacg 5760  
attacctcgg ccgtgcgaaa gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt 5820  
tgaagtaccg ggaaatcgcc gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac 5880  
tgcacgacgc ccgcaggcac ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc 5940  
agcgggttgt cgggttccgg ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct 6000  
gcctctggcg cagcgtcagc taccgccgaa ggcctgtcat cgaccggctt cgactgaagt 6060  
atgagcaacg tcacagcctg tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca 6120  
gctgccgccc gctgggcatg agcaacggcc aactctc 6157

<210> 105

<211> 6227

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-RC1

<400> 105

gttaacgcat ccgaaacctc caccacctc acctagtccg acatccgtac ctiggaacc 60  
gacctgtatt ggcatctcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120  
tccagcccga aggcgtccag actctagcca ccggaggtag tccggtggcc acatcccgctc 180  
gcgcccgaac gtcacgctct tgtgtggcct tcccttggtg tttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgctgtc 300  
aggtcacccg cttcgcggt accagttcct ttcacgaat cgagcttccg gtgccgccgc 360  
gcagcctccc tgaccatcct cagattttat ggagtctcg agtgcccttc gctatctacg 420

tcctcgggct tgctgtcttc gcccagggca catccgagtt catgttgtcc ggactcatac 480  
cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgccgc cggactcttc acctccgcct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgctccgt tgatggctat cgccagcatg cgggtggcccc 600  
ggcgacgcgc ccttctgaca ttctcatca cgttcatgct ggtccacgtc atcggcgcgcg 660  
tcaccagcag cttegaggtc ttgctggta cacgcatcgt gggagccctc gccaatgccg 720  
gattcttggc agtggccctg ggggcggcga tggcgatggt gcccgccgac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtctcttc ggcggtgtca cgatcgcatg ttagccggt gttcccgggg 840  
gcgccttctt gggtgaaatg tggggctggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtgggtggc attatgttcg ccaccccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtcctcac tgcgtcacg caagctccag ctcatgcttg 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgcccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggtttc gactcccgtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140  
tcggatcgtt catcggtgtc agcgtcggag gcaggctcgc cgacaccgg ccgttccaac 1200  
tgctcgctgt cgggtccgca gcaactgtga cgggatggat cgtcttcgt ctcacggcat 1260  
cccacccgc ggtgacattg gtgatgtgt tctgtcaggg cgctttgtcc ttcgcggtcg 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgctctacg ccgccgacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgttcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgcaactgg accggcgctc ggcggttgg 1440  
cgatcggcat ggggtctgagc taccgcgcc cgctctggac gagcgccgcg ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccacctgt ctctgtggcg gcgaccagcg tctgtccacg 1560  
aatctgtccc cgcctgacca gaaaccagga tctgtgagt tggtgactga tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgt cgcgtcgtac cgaggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tgttcagtgc ggcgatacgt gctcggtgag 1740  
ttccactaca gcgaggtacc gagctcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
accctatitt gtttatittt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 1920  
gtcgccctta ttccctttt tgcggcattt tgccttctg tttttgtca ccagaaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 2040  
gatctcaaca gcggtgaag ccttgagagt tticgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgt atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160

caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220  
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg 2280  
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520  
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggcctt cactgattaa gcattggtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaactccc ttaacgtgag 2880  
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940  
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 3240  
tcgggctgaa cgggggggtt gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360  
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct 3600  
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgagccga 3660  
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg 3720  
cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tcccgtgag 3780  
gcggcgtagc aggtcagccg ccccagcggg ggtcaccaac cggggtggaa cggcgccggg 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcaggt ttcgctgtt 3900

gcagtcctc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccggtgg gtcgactagt 3960  
tcagtgatgg tgatggtgat gctcgagaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aattcccata tggatgatgg gatggtggcc catggtatat ctccttctta aagttaaaca 4080  
aaattatttc tagacgccgt ccattatacc tcctcacgtg acgtgaggtg caagcccgga 4140  
cgttccgcgt gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc 4200  
gtgggagccc gcctcgatat gtacaagcat ggggactcgc cgcggactag cggcttcccg 4260  
acacgccgta ctgaccagca gatcagcgat aaacgctggt tctgctggtt aagtggataa 4320  
aaaccaaata atcgatgaac ctggaagtgg agtatccgag ctgaactagc tggatttact 4380  
ccgaaaatac gagcggcgac gaagggtgtt ggaccaccct gccgccgcct tcgaggctcc 4440  
tacttgacta ggaccccgct cgttatgacc agcgtaagtg ctgaacacct ttccggcaaa 4500  
gaccggcccc ctgtcctcgt gtcgtccgat aagcgcggca tccggcacga acttcgaccc 4560  
aaacttcaac aaatcaccac gtcagaaact tttaatgcgt gcggccggcc gatttccggc 4620  
gtgaacggtg tgaccatcgt caacggtccc aaaggttccg gatttggagg ctttcgtcc 4680  
tgcggaagg gctggatctg cccctgtgtg gcgggaaaag tcggcgacaca tcgagcagac 4740  
gaaatttctc aagttgttgc tcatcaactc gggactggat ctgttgcgat ggtgaccatg 4800  
accatgcgcc ataccgctgg gcagcgttt catgatttgt ggactggact ttcggcagcc 4860  
tggaagctg cgaccaatgg ccgccgatgg cgtaccgaac gtgaaatgta cggctgcgac 4920  
ggatacgtac gagctgttga aatcactcac ggaaaaaacg gttggcacgt tcacgtccac 4980  
gctctactca tgttcagcgg tgacgtgagt gagaacatcc tcgaatcctt ctcggatgcg 5040  
atgttcgac ggtggacctc caaactcgtg tctctgggat ttgctgcgcc actacgtaat 5100  
tcagggtggac tcgacgtaag aaagattggt ggagaagctg accaagttct cgctgcatac 5160  
ctgacgaaaa ttgcatccgg ggtcggcatg gaagtcggca gtggcgacgg aaaaagtgg 5220  
cggcacggca accgtgcacc ttgggaaatc gccgttgatg cagtcggagg agatccacaa 5280  
gcgttggaa tctggcgcca gtttgagttc ggttcgatgg gacgccgagc aatcgcatgg 5340  
tctcgtggac tgcgcgccc agctggtctt ggcgtagaac tcacggatgc tcagattgtc 5400  
gaacaggaag aatctgcccc ggtcatggtt gcgacattc cggctcggtc ctggatgatg 5460  
attcggaaact gtgcgcctta cgttttcgga gagatccttg gactcgtgga agcgggcgcg 5520  
acctgggaaa accttcgtga ccacttgcac tatcgattgc ctgcagcgga tgtcggcct 5580  
ccgataatat cgattcgtaa gtgaaatgtc ttggtgtgca acaactttca ctcgtatgaa 5640

ccacacttga gggcatcccc ccgatacttg ccgctttgaa gctgggtgtc tctctgtcag 5700  
ggctgcgata gcaccgcgta gcggcttggc cttgacagag agacggcctg tttcatggtt 5760  
ggtctcgggg ggctgaccgg gcagatagaa aaaggccggc cgatttggct gccgactatt 5820  
tttgcaggta aacctatctc atgagcatca atgaacgtcc cgttgggtatc gcagcgaatg 5880  
cagcttcggt agacgtcgat ggcgtttgta tgggtgtgta tctctcgctt tatgggcaag 5940  
aatcacgct agatcgagat gatgcgttcc tactcctcga tcgacttcag gacgcgttgc 6000  
gacctcaagc caactaagaa ccctccagat ggtctaaacg aggcgcaaac tcgctcctgg 6060  
gcctgcgggc ggagcaccga agcgcgagcg aagcggagcg cgtaggtggg ggagcctgcg 6120  
ggcagcggcg gcggagccgc cgccttggtat ataggtgatc atcggggcca tagcaggtca 6180  
gaggatgttt ttacgatgac tcatgctcac cacgccaagt actgatg 6227

<210> 106

<211> 6231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pNit-RC2

<400> 106

gttaacgcat ccgaaacctc caccacctc acctagtccg acatccgtac cttggaaacc 60  
gacctgtatt ggcatttcag ttggacatcg accagtggcg ttgctagggt caagaccatg 120  
tccagcccga aggcgtccag actctagcca ccggaggtag tccggtggcc acatcccgtc 180  
gcgcccgaac gtcacgctct tgtgtggcct tcccttggtg tttgcgatca gtggcacacc 240  
tctaccgtct gaatttcgag tctggcctcg gctgcgcaca tctcgactg tgacgtgtc 300  
aggtcacccg cttcgcggct accagttcct ttcatcgaat cgagcttccg gtgccgccgc 360  
gcagcctccc tgaccatcct cagattttat ggagtctcgc agtgccttcc gctatctacg 420  
tcctcgggct tgctgtcttc gccaggggca catccgagtt catgttgtcc ggactcatac 480

cggacatggc ccgtgacctc ggggtttcgg tccccgccgc cggactcctc acctccgcct 540  
tcgcggtcgg gatgatcatc ggcgctccgt tgatggctat cgccagcatg cgggtggcccc 600  
ggcgacgcgc ctttctgaca ttctcatca cgttcatgct ggtccacgtc atcggcgcgc 660  
tcaccagcag cticgaggtc ttgctggta cacgcatcgt gggagccctc gccaatgccg 720  
gattcttggc agtggccctg ggggcggcga tggcgatggt gcccgccgac atgaaagggc 780  
gcgccacgtc cgtctcctc ggcggtgtca cgatcgcatg ttagccgggt gtccccgggg 840  
gcgccttcct gggtgaaatg tggggctggc gtgcagcgtt ctgggctgtc gtcgtcatct 900  
ccgcccctgc agtgggtggc attatgttcg ccaccccggc cgagccgctt gcagagtcca 960  
caccgaatgc caagcgtgaa ctgtcctcac tgcgctcacg caagctccag ctcatgcttg 1020  
tcctcggggc gctgatcaac ggcgcaacgt tctgttcgtt cacgtacatg gcgcccacgc 1080  
tcaccgacat ctccggtttc gactcccgtt ggattccgtt gctgctgggg ctgttcgggc 1140  
tcggatcgtt catcgggtgc agcgtcggag gcaggctcgc cgacaccgg ccgttccaac 1200  
tgctcgtgt cgggtccgca gcaactgtga cgggatggat cgtcttcgt ctcacggcat 1260  
cccacccgc ggtgacattg gtgatgtgt tcgtgcaggg cgctttgtcc ttcgcggtcg 1320  
gctcgacttt gatctcccag gtgctctacg ccgccgacgc ggcaccgacc ttgggtggat 1380  
cgttcgcgac ggccgcgttc aacgtcgggt ctgcactggg accggcgctc ggcgggttgg 1440  
cgatcggcat ggggtctgagc taccgcgccc cgctctggac gagcgccgcg ctggtgacac 1500  
tcgcgatcgt catcggcgca gccaccttgt ctctgtggcg gcgaccagcg tctgtccacg 1560  
aatctgtccc cgcctgacca gaaaccagga tctgtgagtg tggtgactga tctgtgcacg 1620  
ctcagcagtc accgcgcgct cgcgtcgtac cgagggccag cgccaacagg tgtgtggagc 1680  
tctgcccctg cctctttcac gcgaactcac tgttcagtgc ggcgatacgt gtcggtgag 1740  
ttccactaca gcgaggtacc gagctcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1800  
accttattt gtttatttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1860  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcctg 1920  
gtcgcctta ttccctttt tgccgcatth tgcccttcctg tttttgctca ccagaaaacg 1980  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 2040  
gatctcaaca gcgtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 2100  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 2160  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2220

gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg 2280  
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2340  
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgcttg atcggtggga accggagctg 2400  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2460  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 2520  
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2580  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 2640  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2700  
atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 2760  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2820  
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcätga ccaaaatccc ttaacgtgag 2880  
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2940  
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt 3000  
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3060  
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3120  
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3180  
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 3240  
tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3300  
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3360  
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3420  
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3480  
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3540  
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt tctttcctgc gttatcccct 3600  
gattctgttg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga 3660  
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg 3720  
cctctccccg cgcggtggcc gattcattaa tgcagctggc acgactagag tcccgtgag 3780  
gcggcgtagc aggtcagccg ccccagcggg ggtcaccaac cgggggtggaa cggcgccggg 3840  
atcgggtgtg tccgtggcgc tcattccaac ctccgtgtgt ttgtgcaggt ttcgctgtt 3900  
gcagtccttc gcaccggcac ccgcagcgag gggctcacgg gtgccggtgg gtcgactagt 3960



tcagtgatgg tgatggtgat gctcgagaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag 4020  
aatccccatg gcgtgatggt gatggtgatg gcccatatgt atatctcctt cttaaagtta 4080  
aacaaaatta tttctagacg ccgtccatta tacctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc 4140  
cggacgttcc gcgtgccacg ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc 4200  
ggccgtggga gcccgcctcg atatgtacaa gcatggggac tcgccgcgga ctagcggctt 4260  
cccgacacgc cgtactgacc agcagatcag cgataaacgc tgtttctgct ggttaagtgg 4320  
ataaaaacca aataatcgat gaacctcgaa gtggagtatc cgagctgaac tagctggatt 4380  
tactccgaaa atacgagcgg cgacgaaggg tgttggaacca ccctgccgcc gccttcgagg 4440  
ctcctacttg actaggaccc cgctcgttat gaccagcgta agtgctgaac acctttccgg 4500  
caaagaccgg cccctgtcc tcgtgtcgtc cgataagcgc ggcatccggc acgaacttcg 4560  
acccaaactt caacaaatca ccacgtcaga aacttttaat gcgtgcggcc ggccgatttc 4620  
cggcgtgaac ggtgtgacca tcgtcaacgg tcccaaaggt tccggatttg gaggccttcg 4680  
ctcctgcgga aagggctgga tctgcccctg ctgtgcggga aaagtcggcg cacatcgagc 4740  
agacgaaatt tctcaagttg ttgctcatca actcgggact ggatctgttg cgatggtgac 4800  
catgaccatg cgccataccg ctgggcagcg tttgcatgat ttgtggactg gactttcggc 4860  
agcctggaaa gctgcgacca atggccgccg atggcgtagc gaacgtgaaa tgtacggctg 4920  
cgacggatac gtacgagctg ttgaaatcac tcacggaaaa aacggttggc acgttcacgt 4980  
ccacgctcta ctcattgtca gcggtgacgt gagtgagaac atcctcgaat ccttctcgga 5040  
tgcatgttc gatcgggtgga cctccaaact cgtgtctctg ggatttgctg cgccactacg 5100  
taattcaggt ggactcgacg taagaaagat tgggtggagaa gctgaccaag ttctcgctgc 5160  
atactgacg aaaattgcat ccggggctcg catggaagtc ggcatggcg acggaaaaag 5220  
tggtcggcac ggcaaccgtg caccttggga aatcgccgtt gatgcagtcg gaggagatcc 5280  
acaagcgttg gaactctggc gcgagtttga gttcggttcg atgggacgcc gagcaatcgc 5340  
atggtctcgt ggactgcgcg cccgagctgg tcttggcgta gaactcacgg atgctcagat 5400  
tgtcgaacag gaagaatctg ccccggtcat ggttgcgata attccggctc ggtcctggat 5460  
gatgattcgg aactgtgcgc cttacgtttt cggagagatc cttggactcg tggaagcggg 5520  
cgcgacctgg gaaaaccttc gtgaccactt gcattatcga ttgcctgcag cggatgtgcg 5580  
gcctccgata atatcgattc gtaagtgaag tgtcttgggt tgcaacaact ttcactcgta 5640  
tgaaccacac ttgagggcat ccccccata cttgccgctt tgaagctggg tgtctctctg 5700

tcagggctgc gatagcaccg cgtagcggct tggccttgac agagagacgg cctgtttcat 5760  
ggttggctctc ggggggctga ccgggcagat agaaaaaggc cggccgattt ggctgccgac 5820  
tattttttgca ggtaaaccga tctcatgagc atcaatgaac gtcccgttgg tatcgcagcg 5880  
aatgcagctt cggtagacgt cgatggcggt gtgatgggtg tgtatctctc gctttatggg 5940  
caagaaatca cgctagatcg agatgatgcg ttctactcc tcgatcgact tcaggacgcg 6000  
ttgcgacctc aagccaacta agaaccctcc agatggtcta aacgaggcgc aaactcgctc 6060  
ctgggcctgc gggcggagca ccgaagcgcg agcgaagcgg agcgcgtagg tgggggagcc 6120  
tgcgggcagc ggcggcggag ccgccgcctt ggtaataggt gatcatcggg gccatagcag 6180  
gtcagaggat gtttttacga tgactcatgc tcaccacgcc aagtactgat g 6231

<210> 107

<211> 124

<212> DNA

<213> Rhodococcus erythropolis

<220>

<223> mutated TipA gene promoter

<400> 107

cgccccgggct gagggagccg acggcacgcg gcggctcacg gcgtggcacg cggaacgtcc 60  
gggcttgcac ctacgtcac gtgaggaggt ataatggacg gcgtcagaga aggggacggc 120  
catg 124

【 0 1 4 4 】

【配列表フリーテキスト】

配列 1 ～ 4 8 : プライマー、リンカー

配列 4 9 ～ 5 6 : ベクター

配列 5 7 ～ 8 9 : プライマー、リンカー

配列 9 0 : 内在性プラスミド pRE8424

配列 91～106：ベクター

配列 107：改変 Tip A 遺伝子プロモーター

【図面の簡単な説明】

【図 1】

誘導型発現ベクターのバックボーンになるプラスミド pHN136 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。

【図 2】

チオストレプトン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN143 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を、Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

【図 3】

Inducer cassette を持つプラスミド pHN62 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

【図 4】

Expression cassette を持つプラスミド pHN153 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。CIAP は（Calf Intestine Alkaline Phosphatase を Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

【図 5】

テトラサイクリン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN169 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を、Blu. は平滑末端（Blunt end）を意味する。

【図 6】

PIP をレポーター遺伝子として持つ誘導型発現ベクタープラスミド pHN170、pHN171 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字

は塩基対 (キロベースペア:kb) を示す。CIAPはCalf Intestine Alkaline Phosphataseを意味する。

【図 7】

マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア:kb) を示す。

【図 8】

マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア:kb) を示す。

【図 9 a】

pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LNH1、pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 のマップを示す図である。各領域の機能と、プラスミドのマップを示す。

【図 9 b】

pTip-NH1、pTip-LNH1 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

【図 9 c】

pTip-CH1、pTip-LCH1 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

【図 9 d】

pTip-NH2、pTip-LNH2 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

【図 9 e】

pTip-CH2、pTip-LCH2 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA

配列を示す。

【図 10】

pTip-CH1.1、pTip-LCH1.1、pTip-CH2.1およびpTip-LCH2.1のマップを示す図である。

【図 11】

PIP活性測定のためのコントロールプラスミドpHN172、pHN173の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対（キロベースパー：kb）を示す。また、CIAPはCalf Intestine Alkaline Phosphataseを意味する。pHN170は、「Expression cassette」と「Inducer cassette」両方をもつものに対して、pHN173は「Expression cassette」のみをもち、pHN172は両cassetteを持たない。

【図 12】

TipA遺伝子プロモーター配列を示す図である。

【図 13】

TipA遺伝子プロモーターのTipA-LG10プロモーターへの改良を示す図である。

【図 14】

pRE8424のマップを示す図である。図中には主な制限酵素認識部位が示されていて、オープンリーディングフレーム（ORF）が矢印で示されている。DSOとSSOの位置が四角で示されている。

【図 15】

pRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22のRepタンパク質の5カ所の保存された領域（Motif IV、Motif I、Motif II、Motif III、C-terminal motif）のアミノ酸配列を示す図である。Repタンパク質の機能に重要とされるチロシン残基は四角で囲ってある。

【図 16】

pRE8424、pAP1、pBL1、pJV1、pIJ101、pSN22のDSOと考えられる配列のうち、特に保存されたDNA配列を示す図である。

【図 17】

pRE8424のSSO、即ち配列表中の配列番号90のうちヌクレオチド番号5268から

5538の配列と、その取りうる二次構造を示す図である。

【図18-1】

pTipベクターのマップを示す図である。

【図18-2】

pNitベクターのマップを示す図である。

【図19】

TipA-LG10p - MCS - ALDHt、Nit-LG10 - MCS - ALDHtのDNA配列を示す図である。TipA遺伝子プロモーターの野生型-10領域配列はCAGCGTで、Nitプロモーターの-10領域配列はTATAATで、おのおの四角で囲まれている。

【図20】

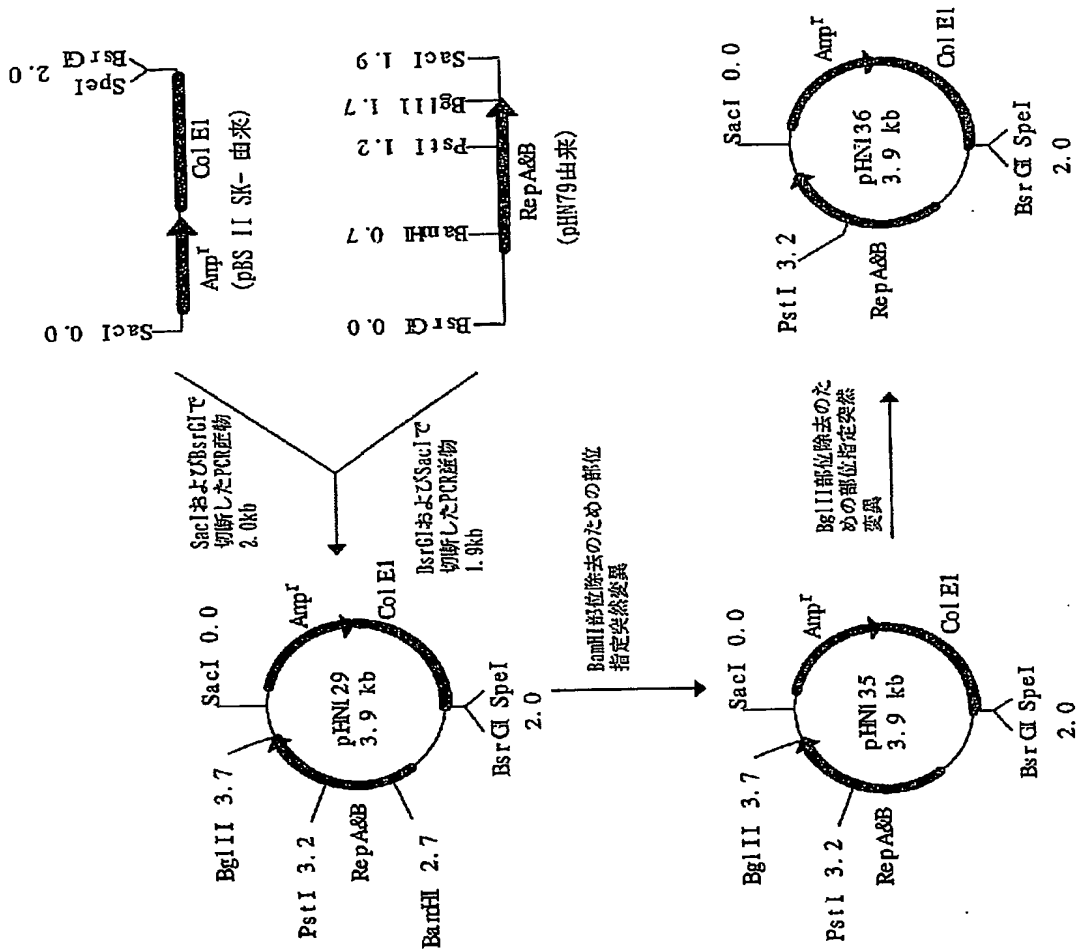
R. erythropolis JCM3201株をpHN380、pHN410、pHN381、pHN387、pHN389で、形質転換し、PIPのペプチダーゼ活性を測定した結果を示す図である。

【図21】

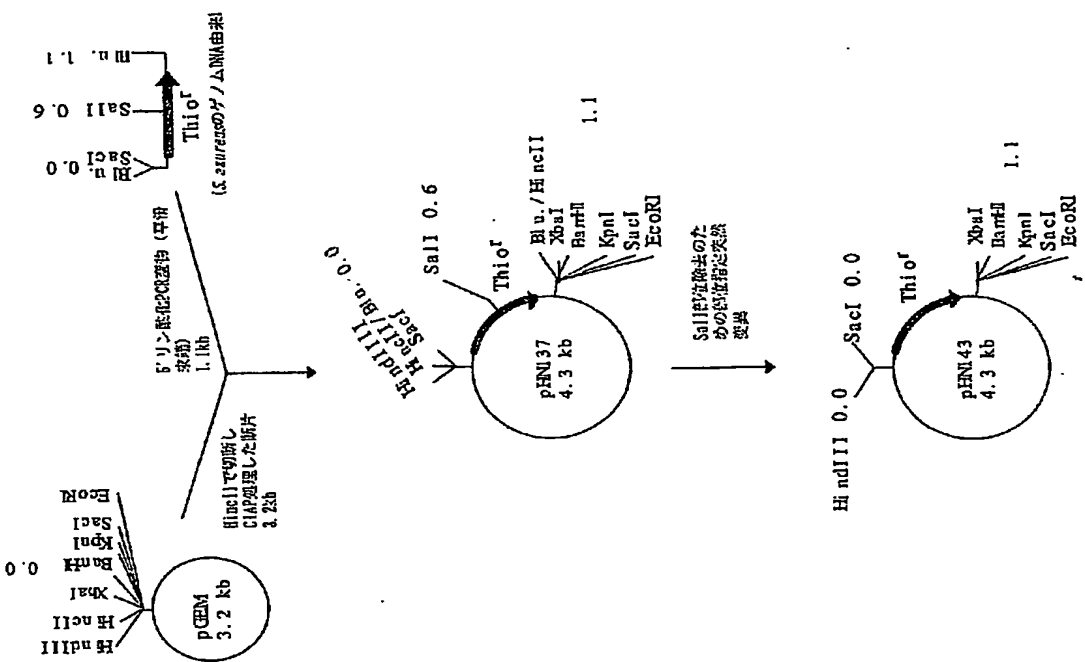
PIP、GFPを不和合性を起こさない2つのベクターに組み込み、単一のR. erythropolis JCM3201細胞で、発現、精製し、SDSポリアクリルアミド電気泳動結果後、ゲルをクマシーブリリアントグリーンG-250で染色した結果を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】

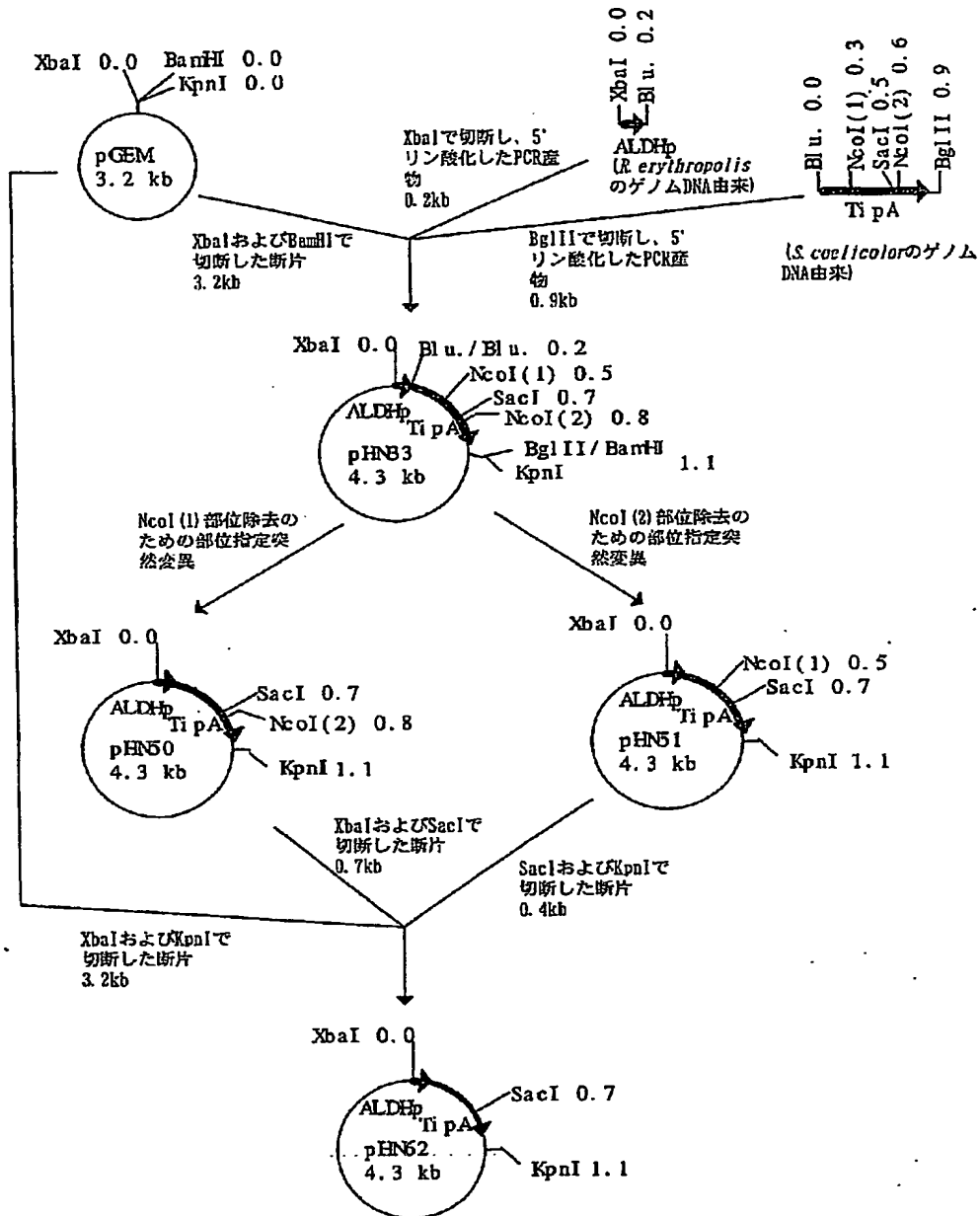


【図2】

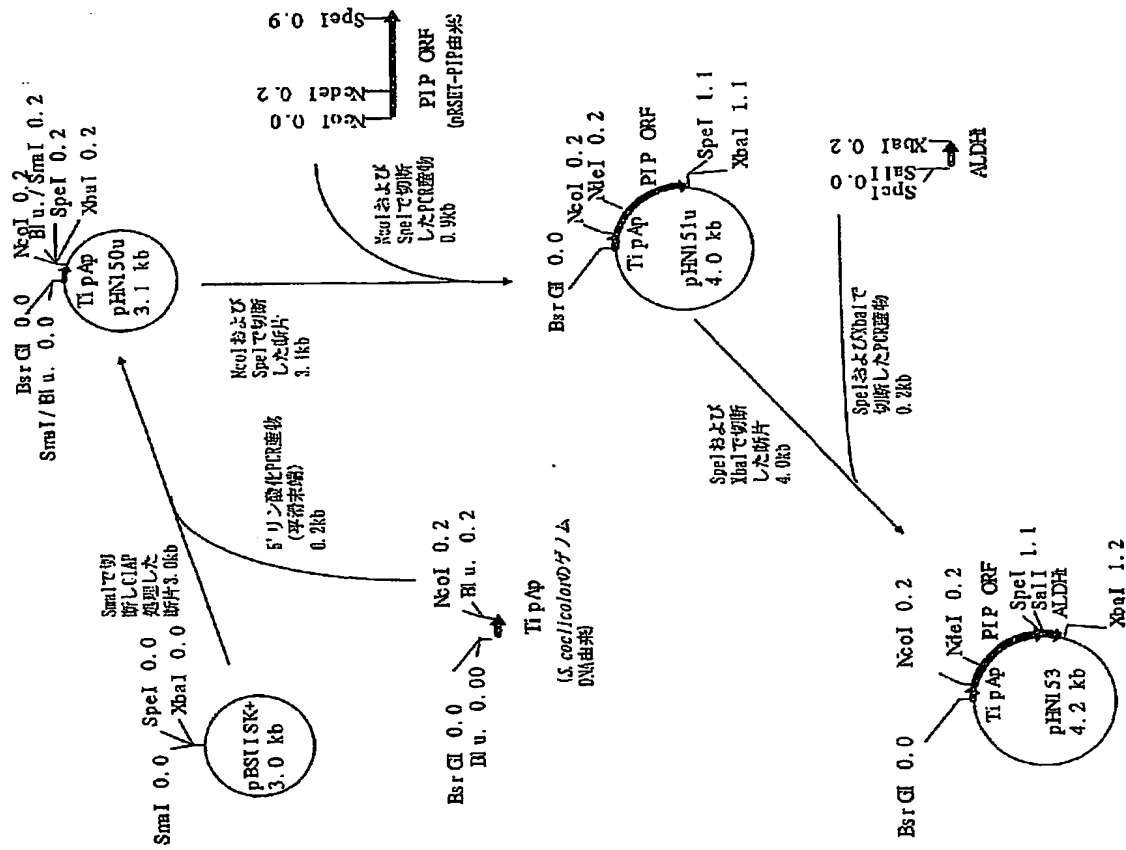




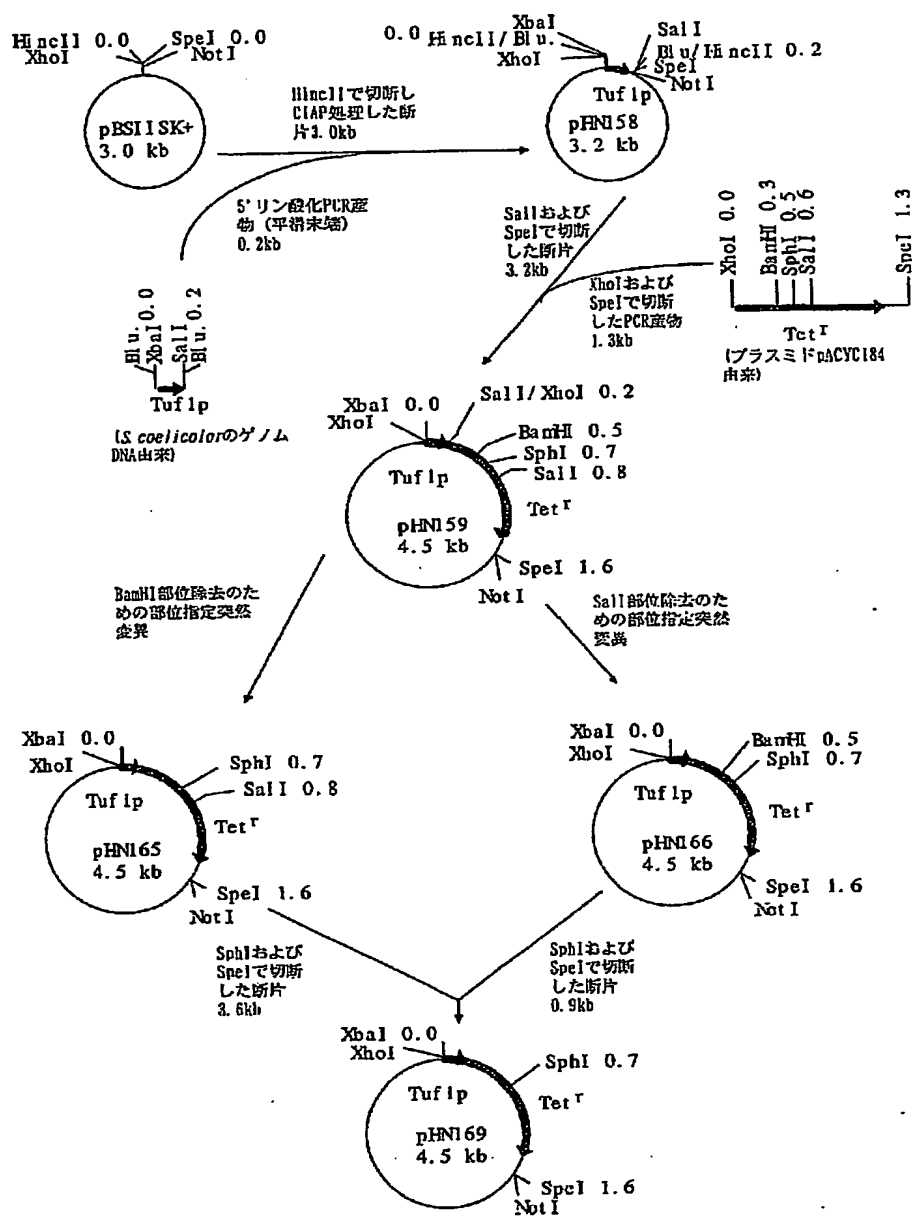
【図 3】



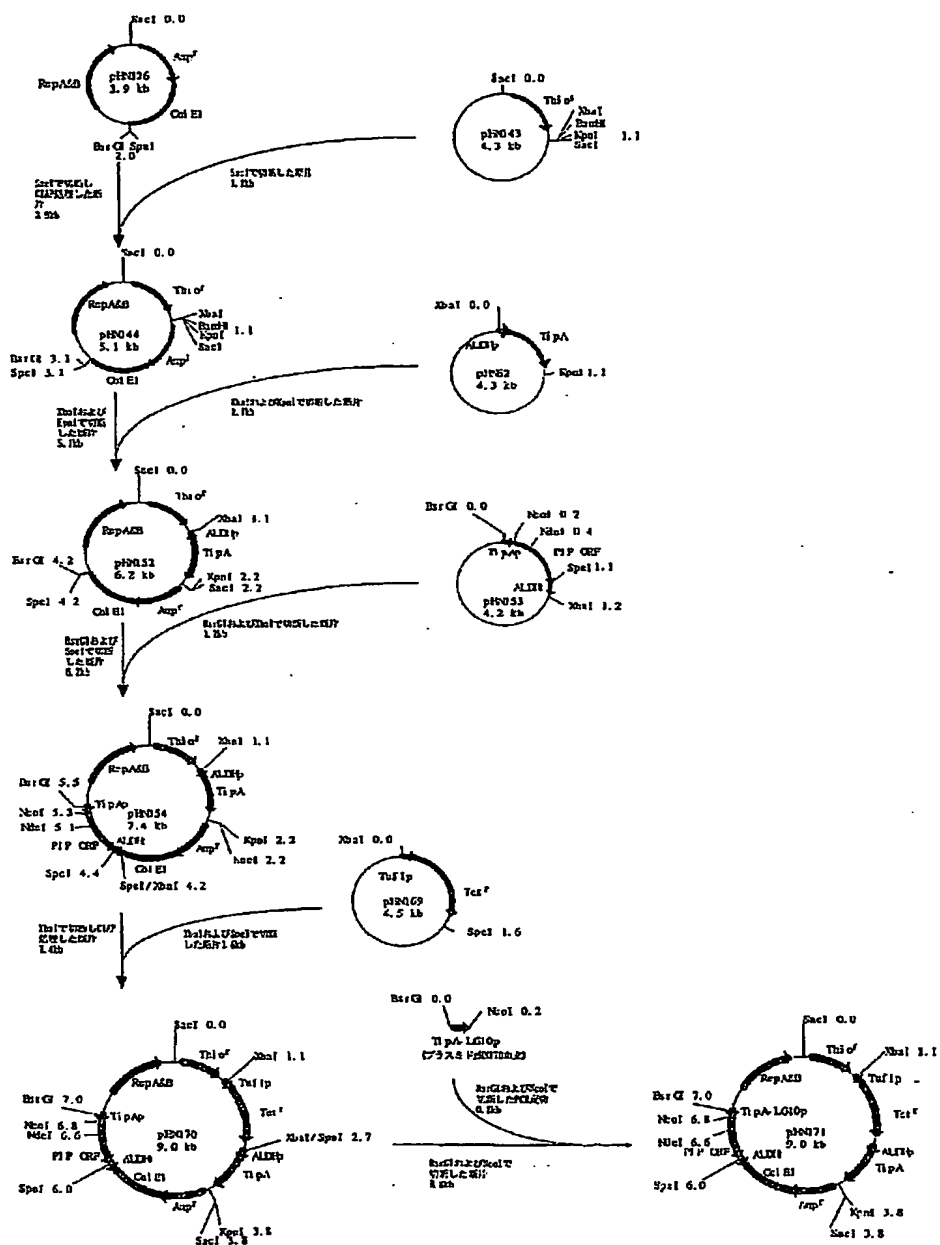
【図4】



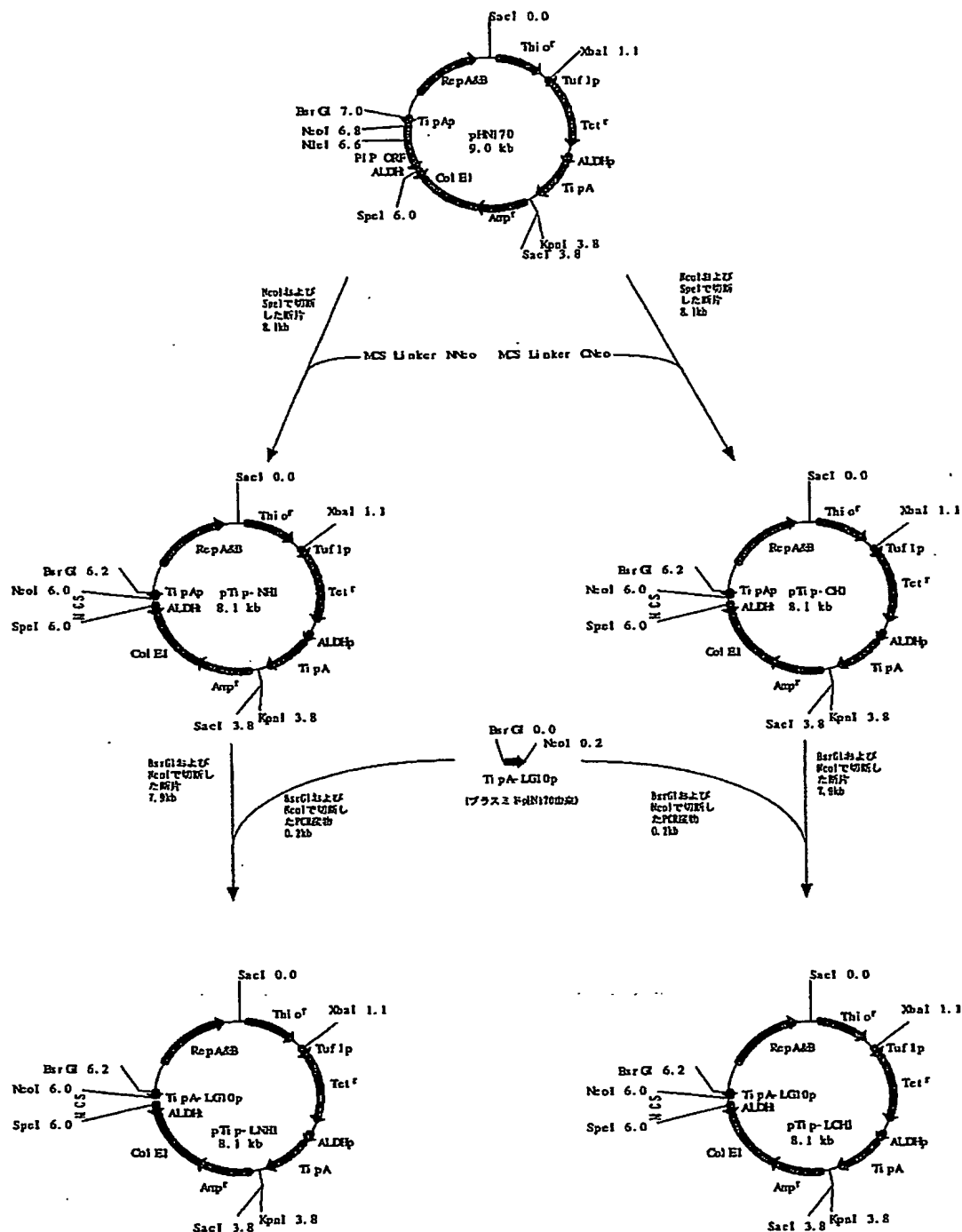
【圖 5】



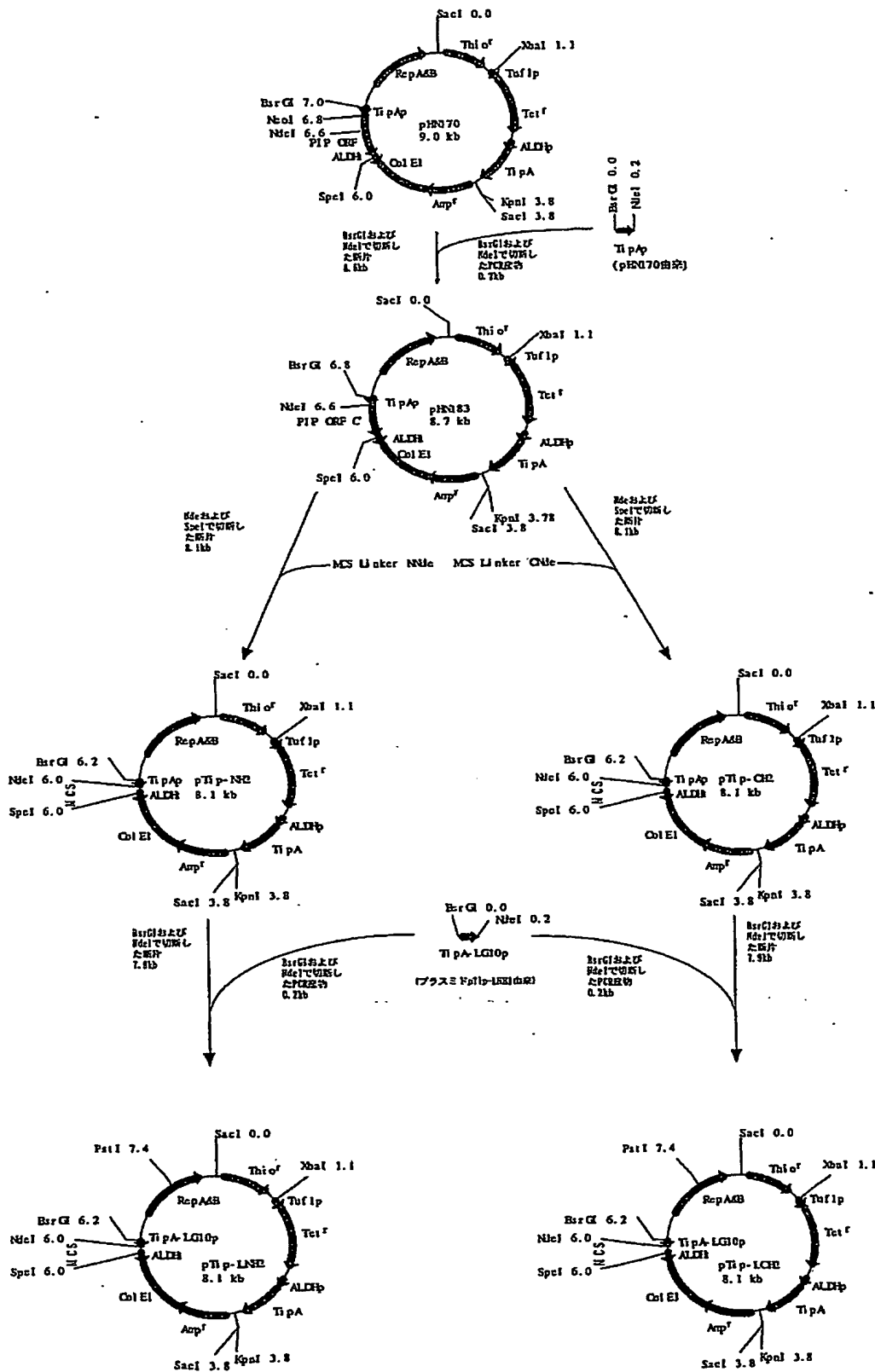
【図 6】



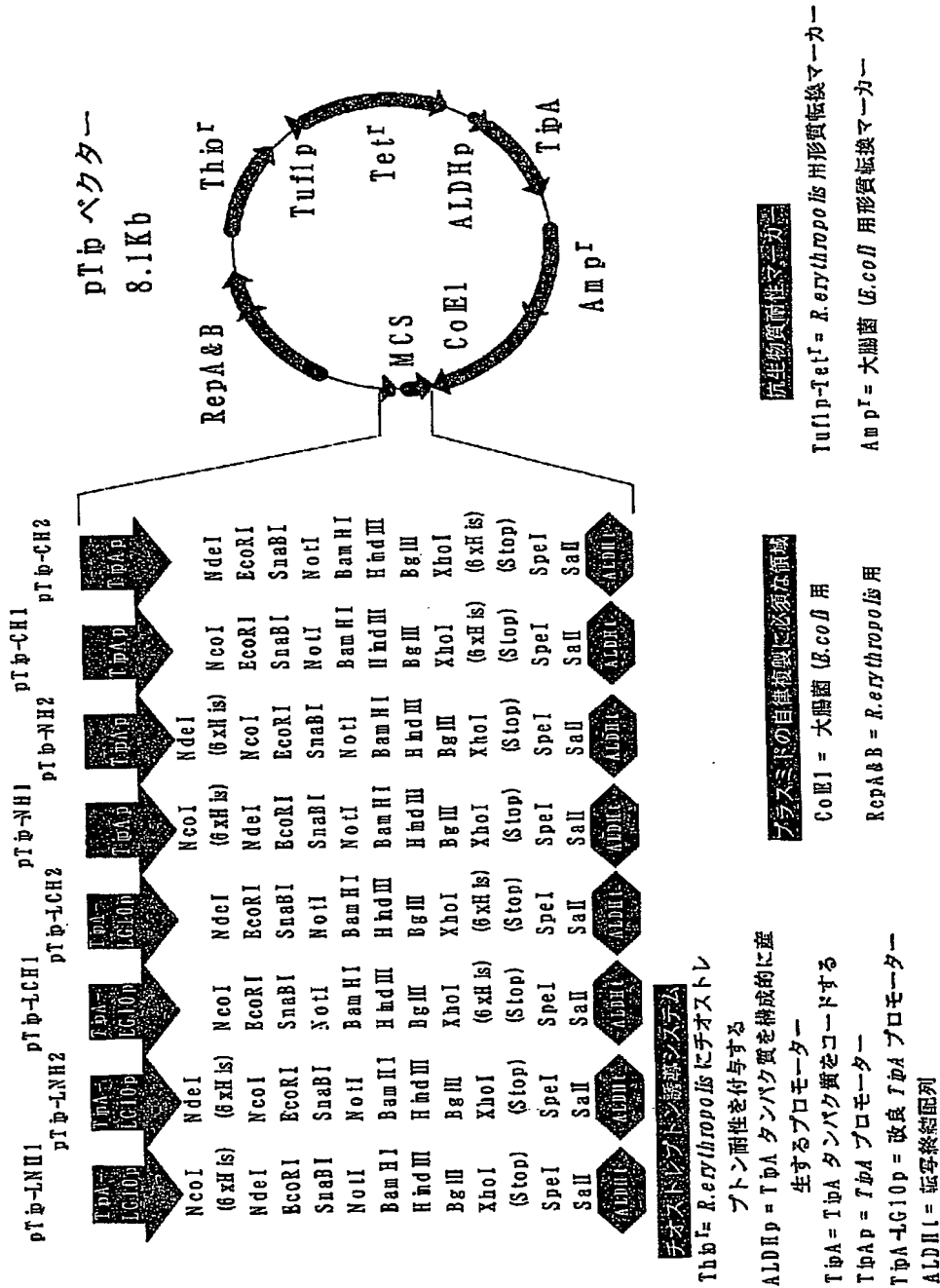
【図7】



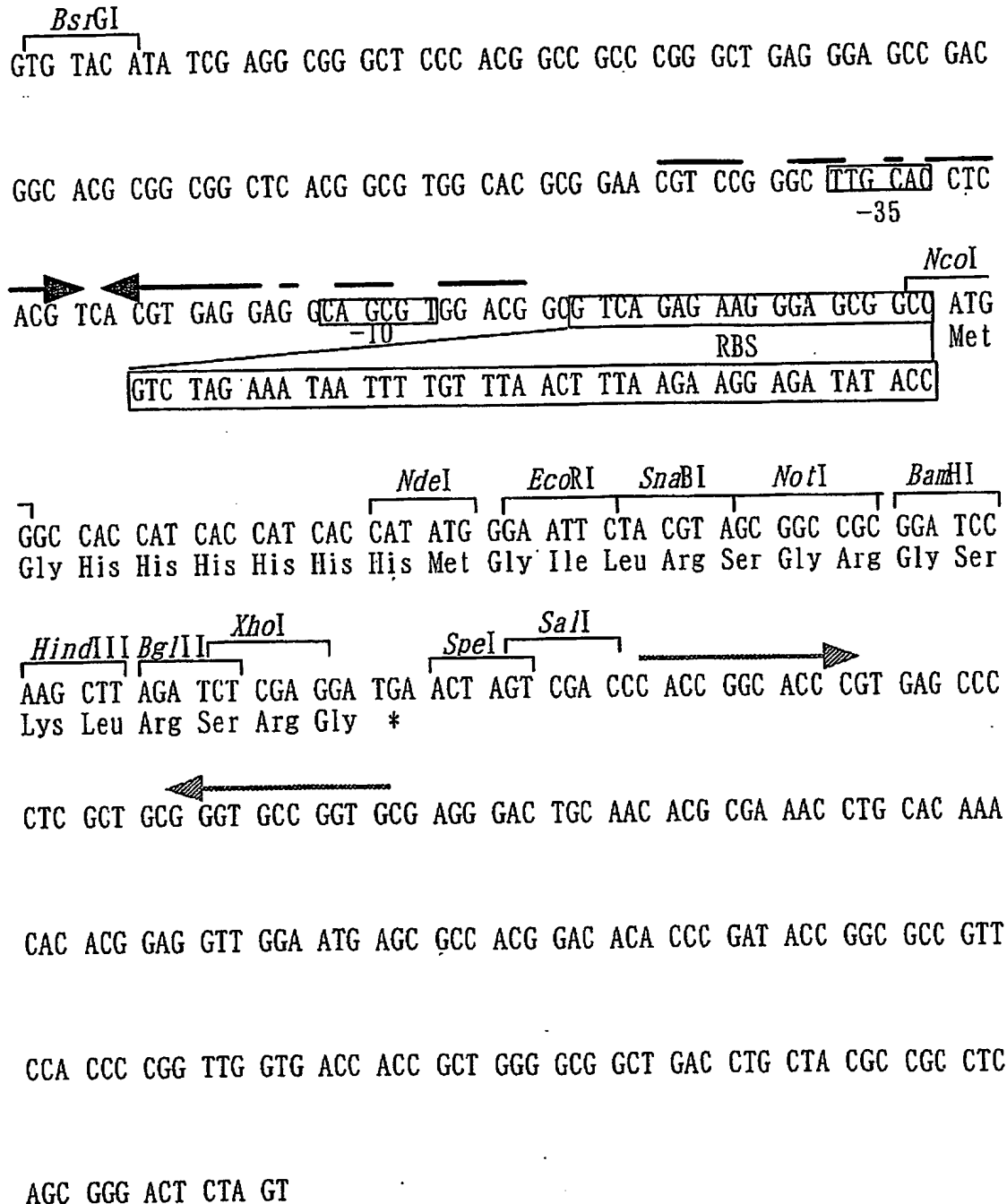
【図8】



【図9a】

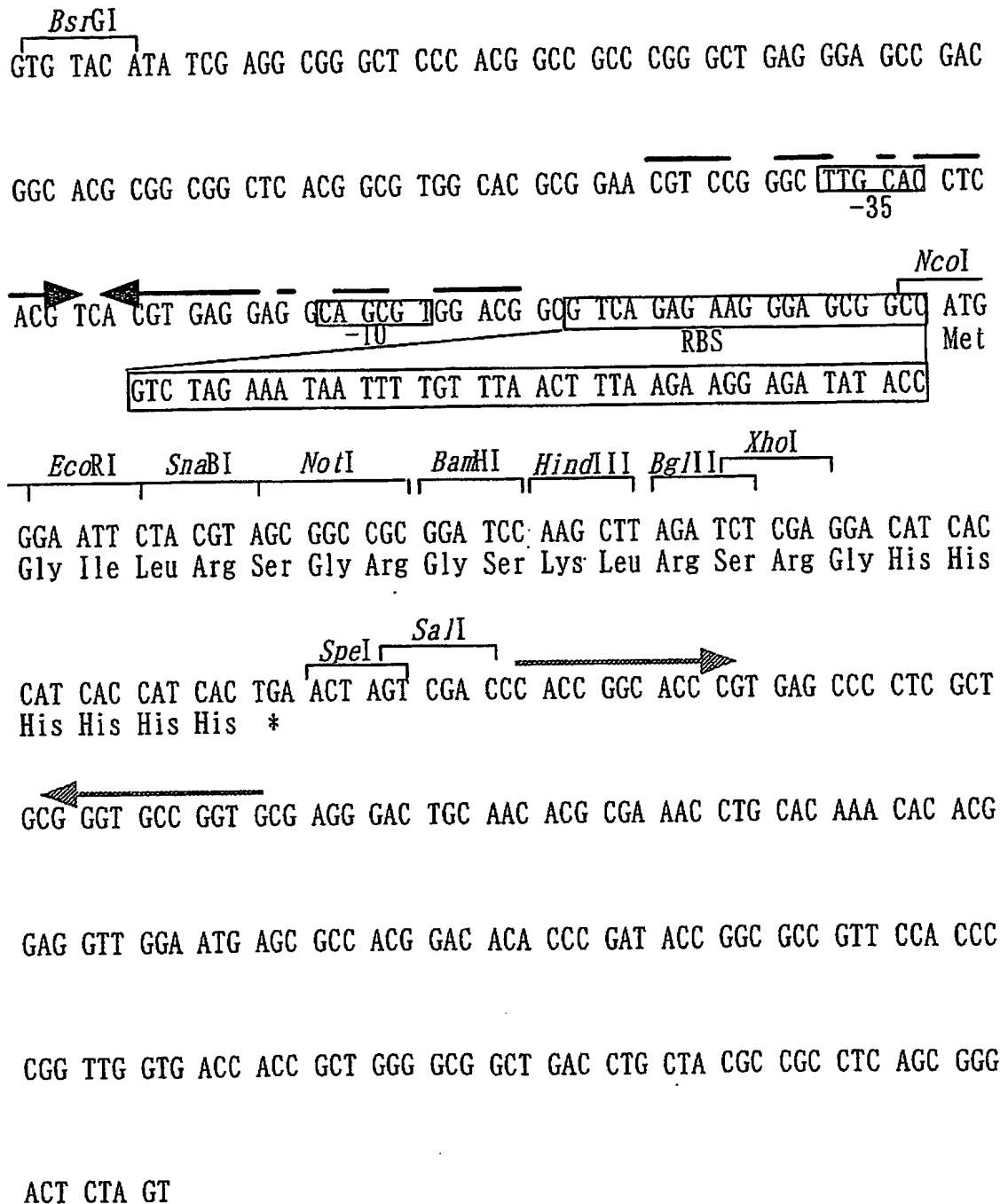


【図9b】



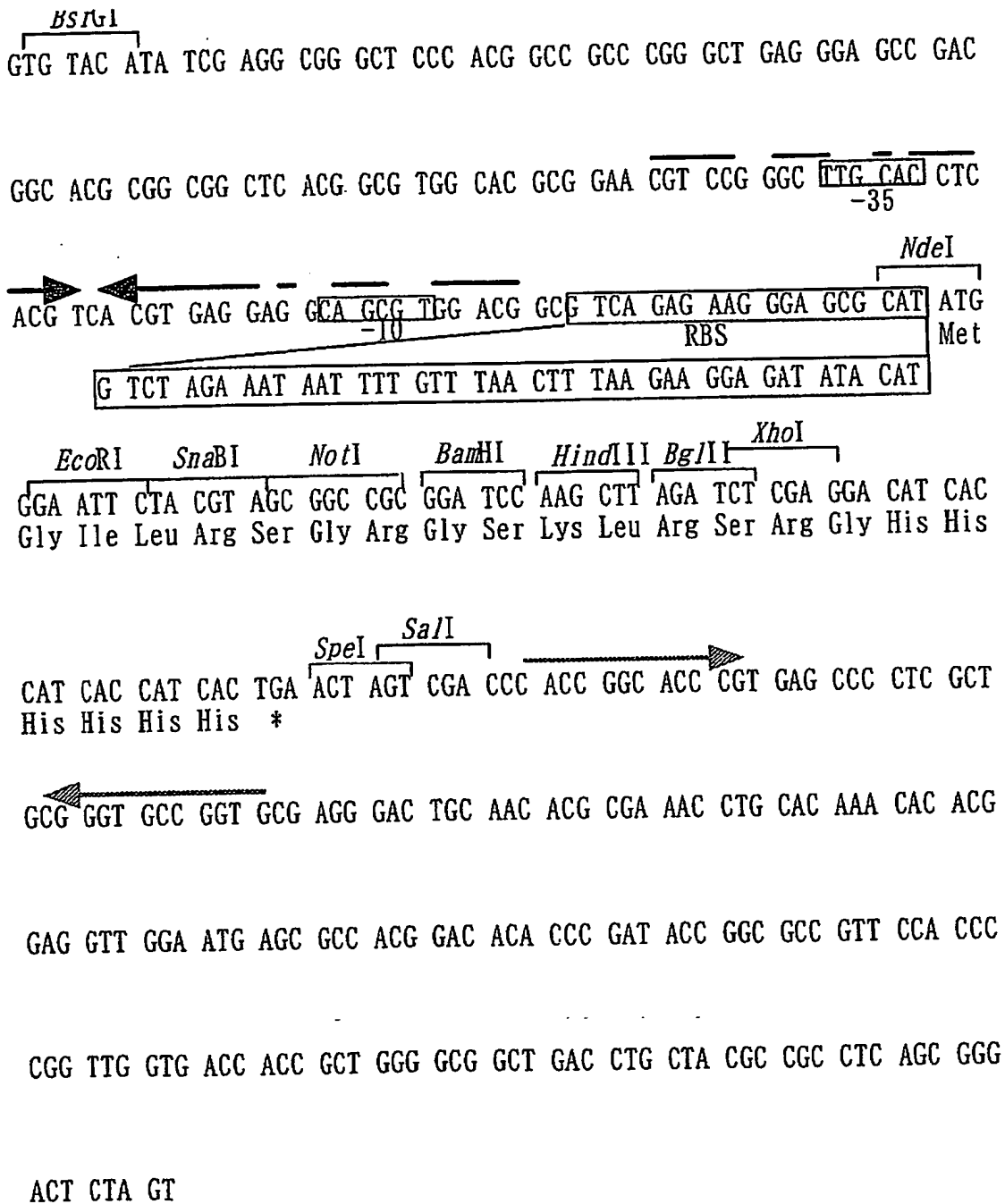


【図 9 c】

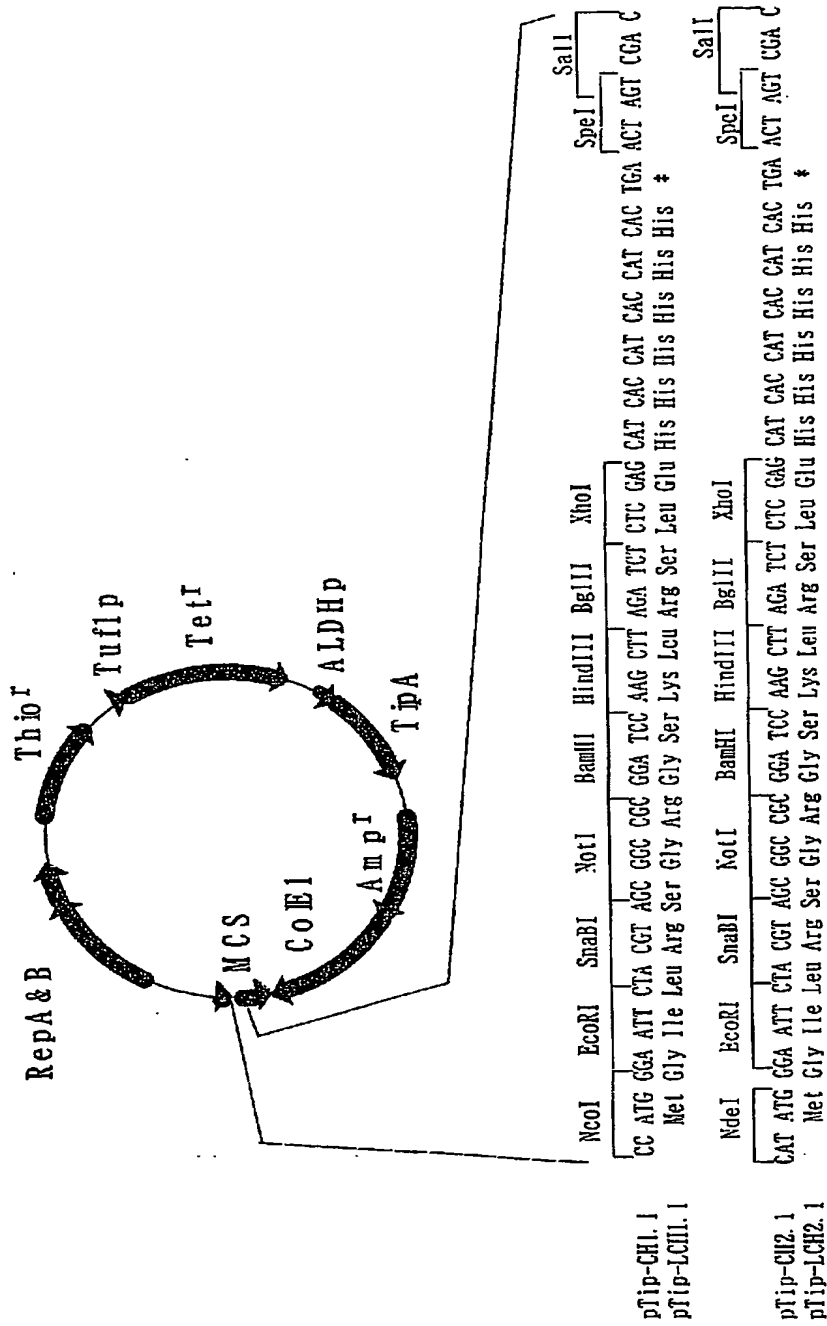




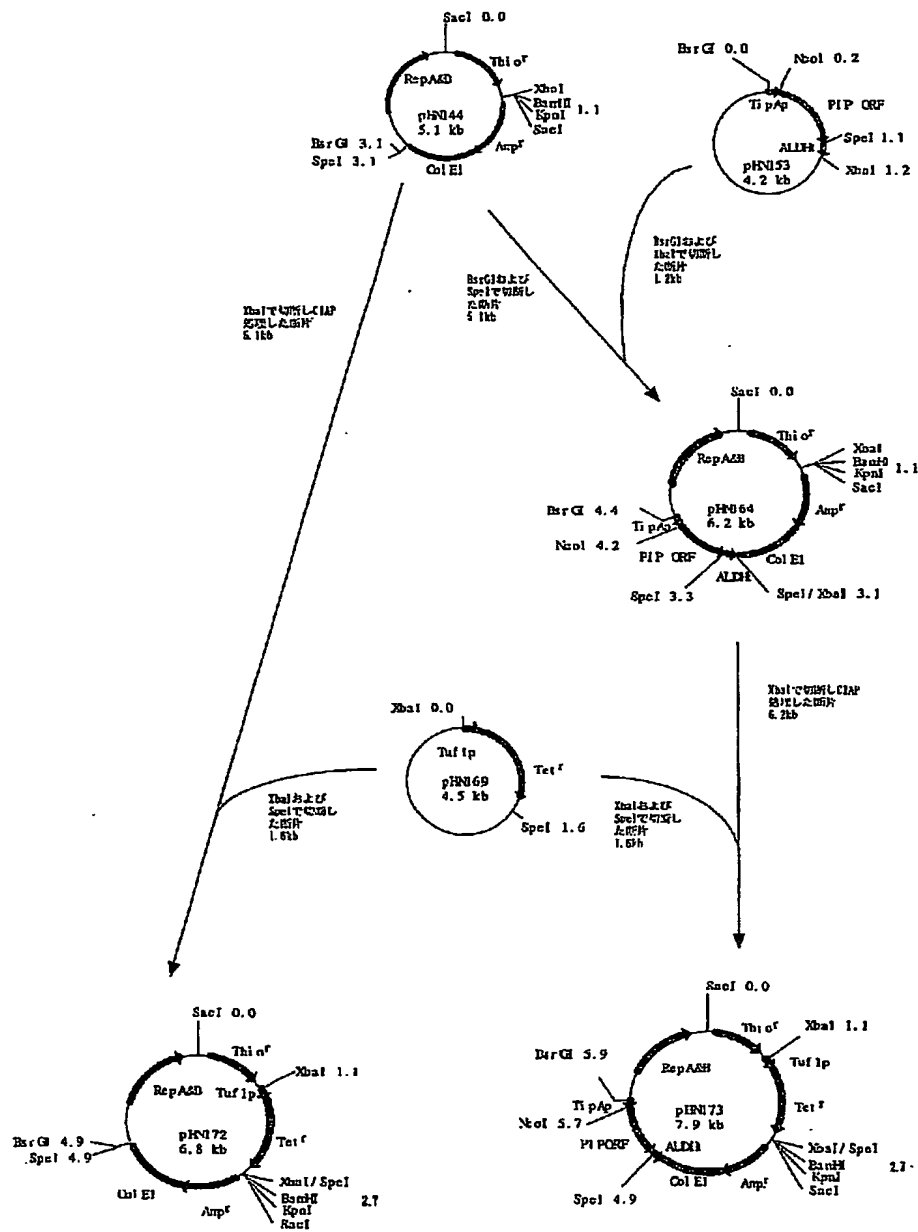
【図 9 e】



【図10】



【図11】



【図 12】

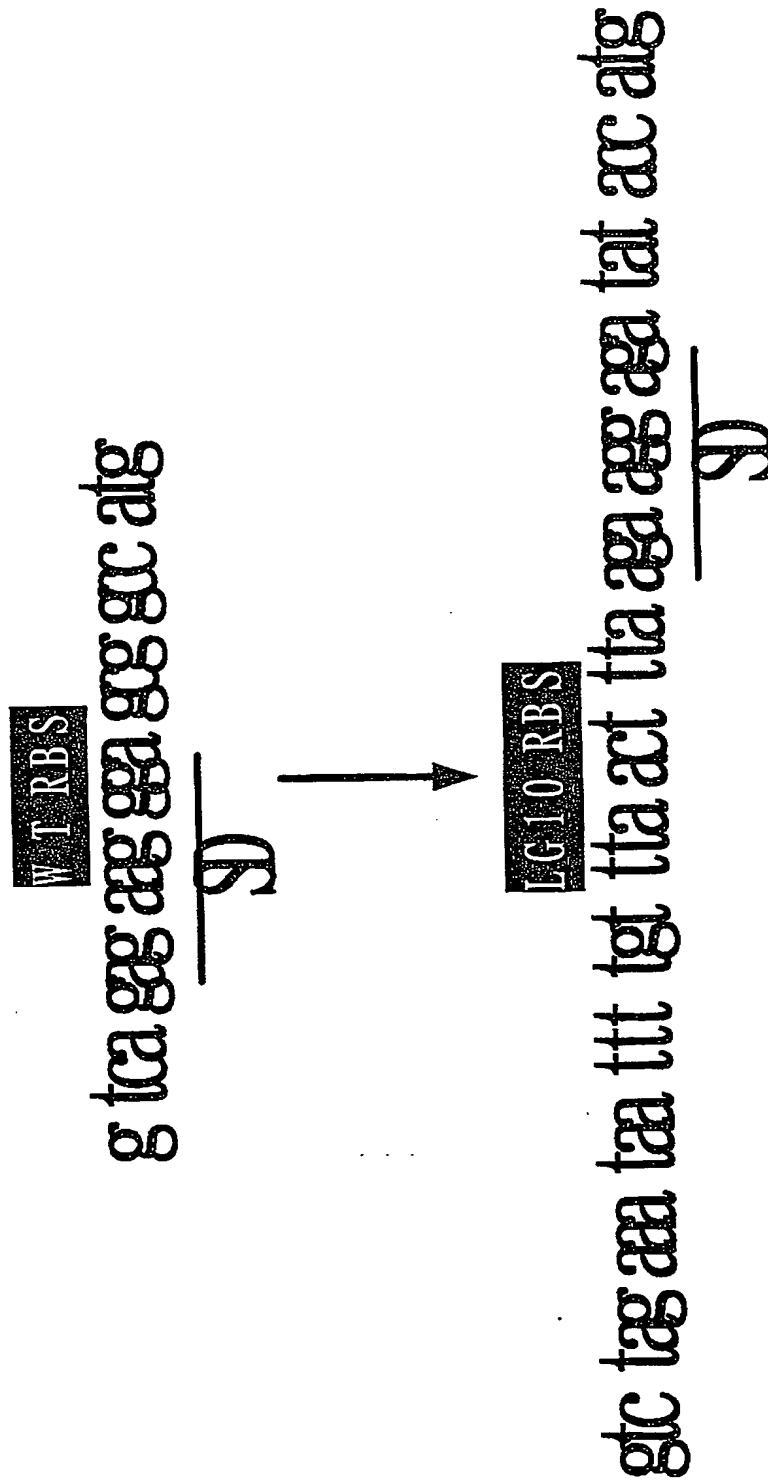
cgccgggtgaggagccgacggcggcggtcac

ggcgtggcacgggaacgtccggctgcacctcacgtc  
 -35

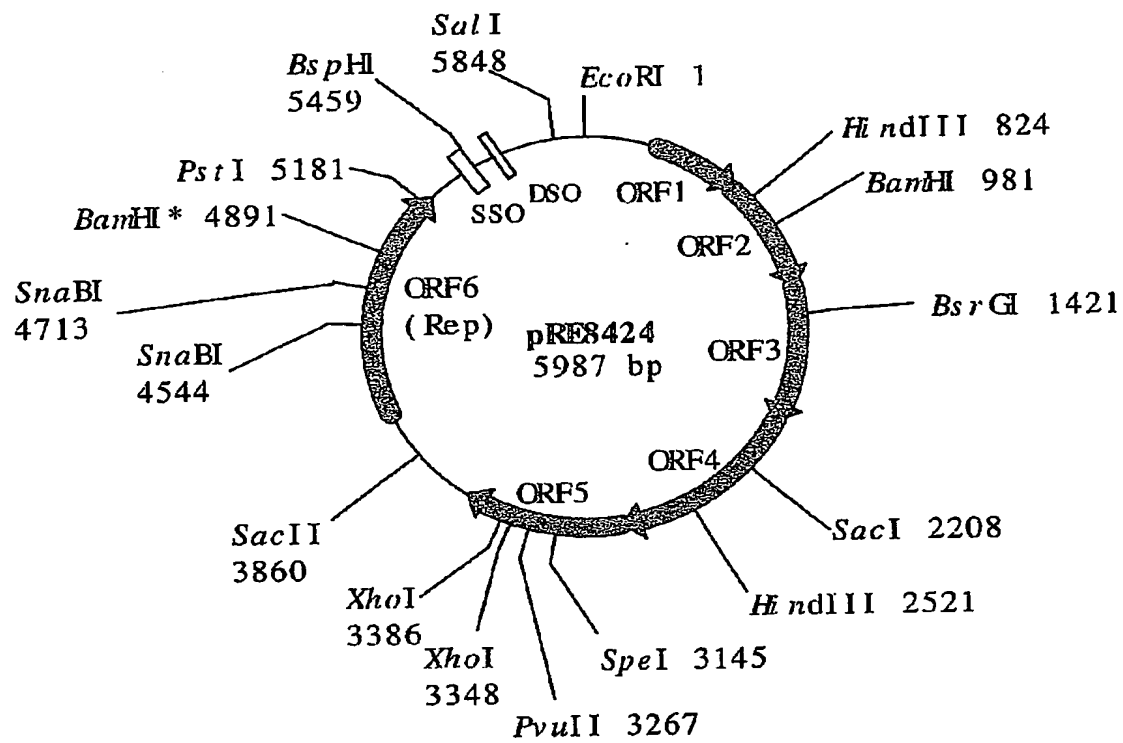
acgtgaggagcagcgtggacggcgtcagagaaggagc  
 -10 +1 SD  
 RBS

ggccatg

【図 13】



【図 14】





【図 15】

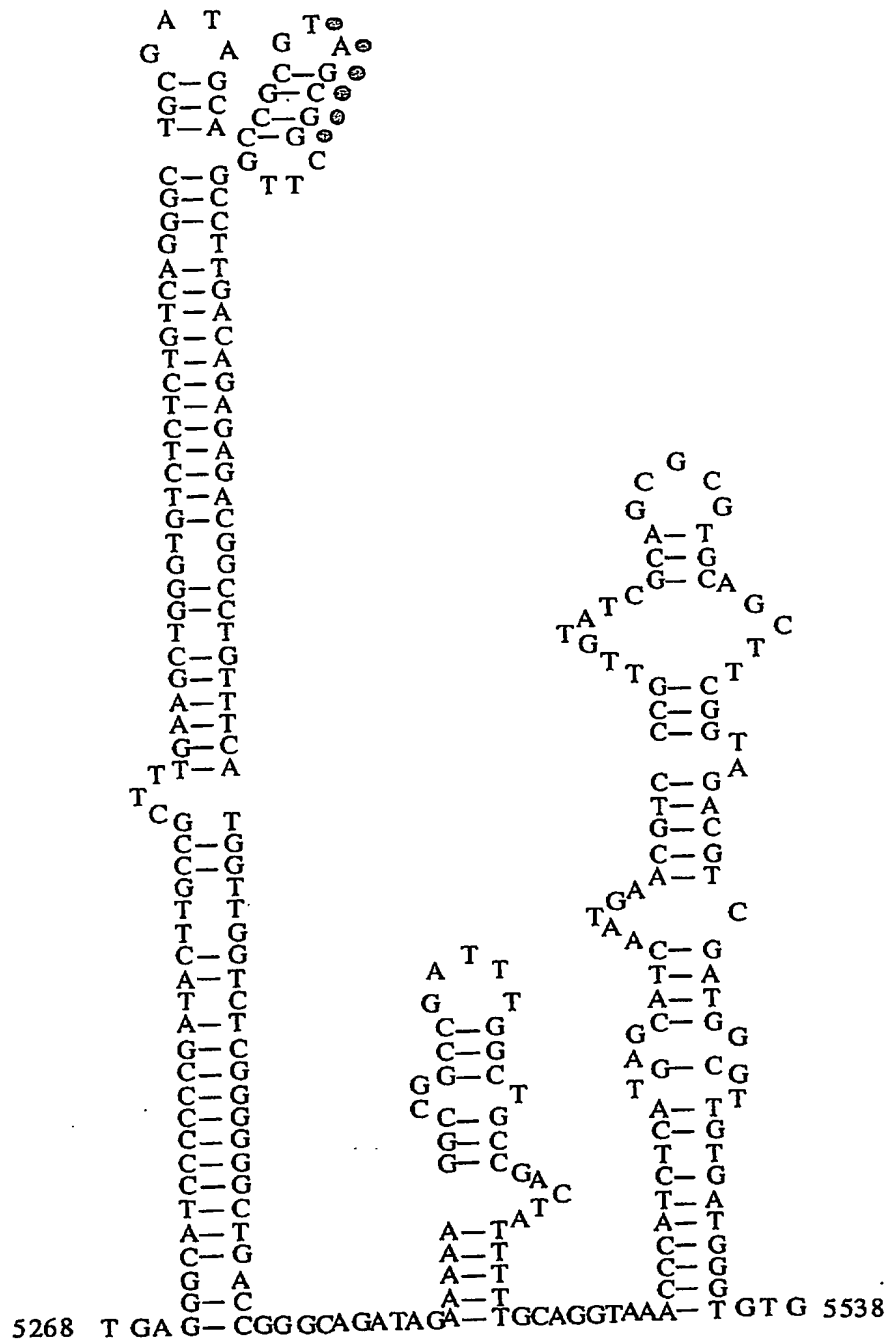
|           | Motif IV                    | Motif I      | Motif II                             | Motif III                 |
|-----------|-----------------------------|--------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Consensus | GLXXCGXXWCPXC               | Xvt XTXRH    | gXXg XXr a Xe Xt Xg XXn GwHXHXh Xi X | l a XXXXKqX               |
| pRE8424   | 68 GLRSCGKGW CPCC           | 26 M/TMIVRH  | 33 GCDGYVRAVEI THCK-NGWHVHVHALL      | 53 LAAYLTKI AS            |
| pAPI      | 138 GLHTCGSVWACPVC          | 27 M/LTLTQRH | 33 GLVGYYVRANEI THCK-HGWVHSVHLI      | 67 I GNVS KMQT            |
| pBLI      | 76                          | 76 MFVGTVRH  | 34 VEHTYSDYEVTDS WA-NGWLHRNMLL       | 54 NATYLAKGWS             |
| pJV1      | 38 GLVRCGR1 W-CPEC          | 27 LVFTFARH  | 77 GYI GWRAAEVTRSKKNGYPHLNLLV        | 80 LI EYLTKNQD            |
| pIJ101    | 20 GLMRCCGR1 WLC P VC       | 27 LVFTFARH  | 59 GYVGM RATEVTGQI NGWP HI HAI V     | 69 LAEYI AKTQD            |
| pSN22     | 20 GLMRCCGR1 WLC P VC       | 27 LVFTFARH  | 59 GYVGM RATEVTGQI NGWP HI HAI V     | 69 LAEYI AKTQD            |
|           | ** ** *                     | :... * **    | . . . . . * : * * : : :              | : . . . . . * : * * : : * |
|           | C-terminal motif            |              |                                      |                           |
| Consensus | Wey EXa XXgr Rai XWkr gl r  |              |                                      |                           |
| pRE8424   | 276 WREFEFCSMRRRAI AWRGLR   |              |                                      |                           |
| pAPI      | 365 WKYEKASFGRRALTW SKLR    |              |                                      |                           |
| pBLI      | 250 WREYEVGSKNLRS-SW ERGAK  |              |                                      |                           |
| pJV1      | 352 WAQYEEALAGRRAI EWTRGLR  |              |                                      |                           |
| pIJ101    | 288 WHEYERATRGRRRAI EWTRYLR |              |                                      |                           |
| pSN22     | 288 WHEYERATKGRRRAI EWTRYLR |              |                                      |                           |
|           | * . . . * * * * : : :       |              |                                      |                           |

【図 16】

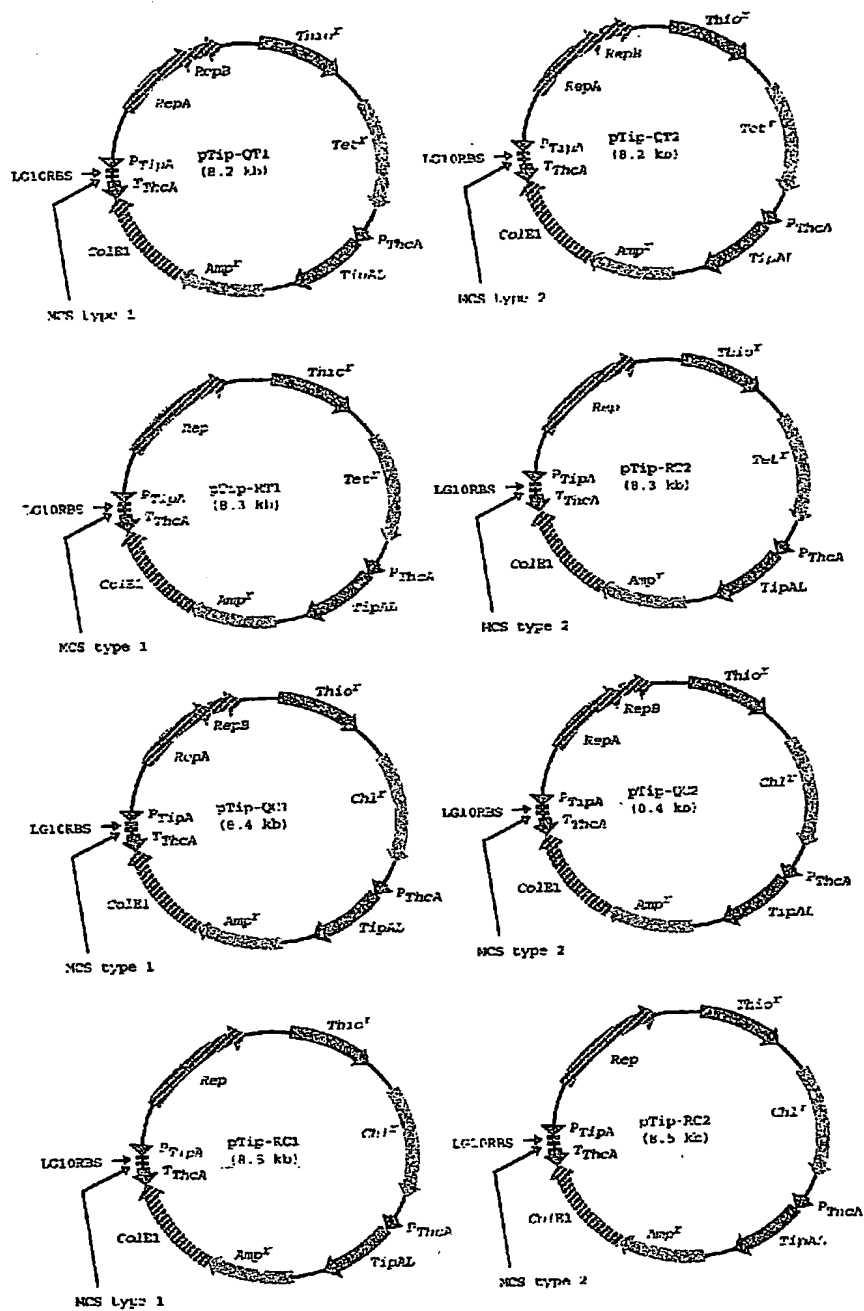
pRE8424 5705 CGAAGCGAAGCGG-GA-CCCGCTT---AAGCTGGGGGAG-  
 pAP1 2378 CAGCTATGC-C-GA-AAAGTTT---AAGCAA---  
 pBL1 1314 GAAATACAA-CTGA-AAGGCTTAAGCAACCGCA--  
 pJV1 3375 CTGGCAAAATACCGA-GCCCTT---AAGCTTAAGGGTT  
 pIJ101 1346 GAGCGAATA-CCGA-AAGGCTT---CGCAAGAAA--  
 pSN22 7805 GACCGAATACTCTCCCGCTT---CGCAAGAAA-  
 Nicking site



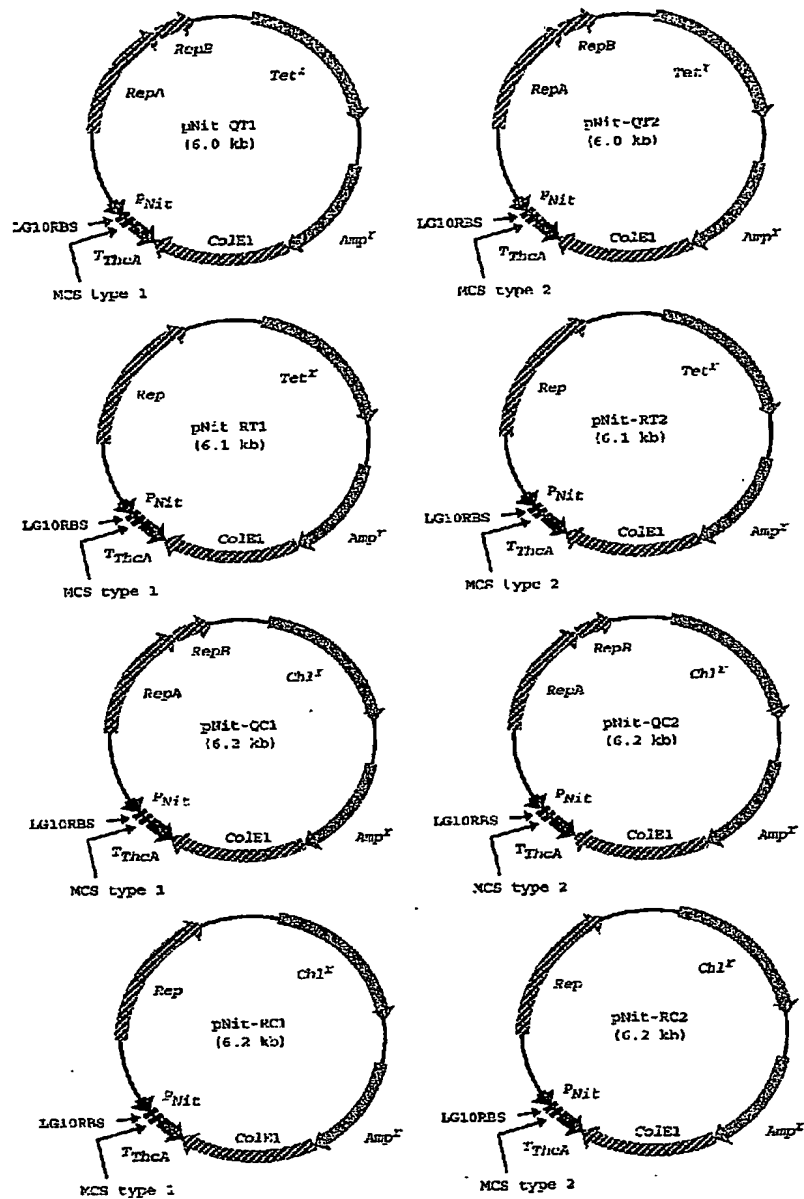
【図 17】



【図18-1】



【図18-2】



【図 19】

**Ti pA-LGI0p or Ni t -LGI0p**

$R_{17}G$  —————  
 TG TAC ATA TGG AGG GGT CCC AGG GGC GGT GAG GCA GGC GAC GGC AGG GAG CTC AUG UUG UUG CAC GGC GAA GTT CCG GGC  
 TTT CAG CTC ACG TCA GGT GAG GAG GCA CCG TGG AGG  
 TTA TAA  
 -35 -10  
 TAA TAA  
 -10

# INVS

## Type 1

CC ATG GGC CAC CAT CAC CAT CAC CAT ATG CGA ATT CTA CCT AOC CCC GGA TOC AAG CTT AGA TCT CTC GAG CAT CAC CAT CAC CAT CAC TGA  
NcoI Met Gly His His His His His His Met Ile Leu Arg Ser Gly Arg Gly Ser Lys Leu Arg Ser Leu Qu H<sub>b</sub> H<sub>s</sub> H<sub>s</sub> H<sub>s</sub> H<sub>s</sub> H<sub>s</sub> H<sub>s</sub> H<sub>s</sub>

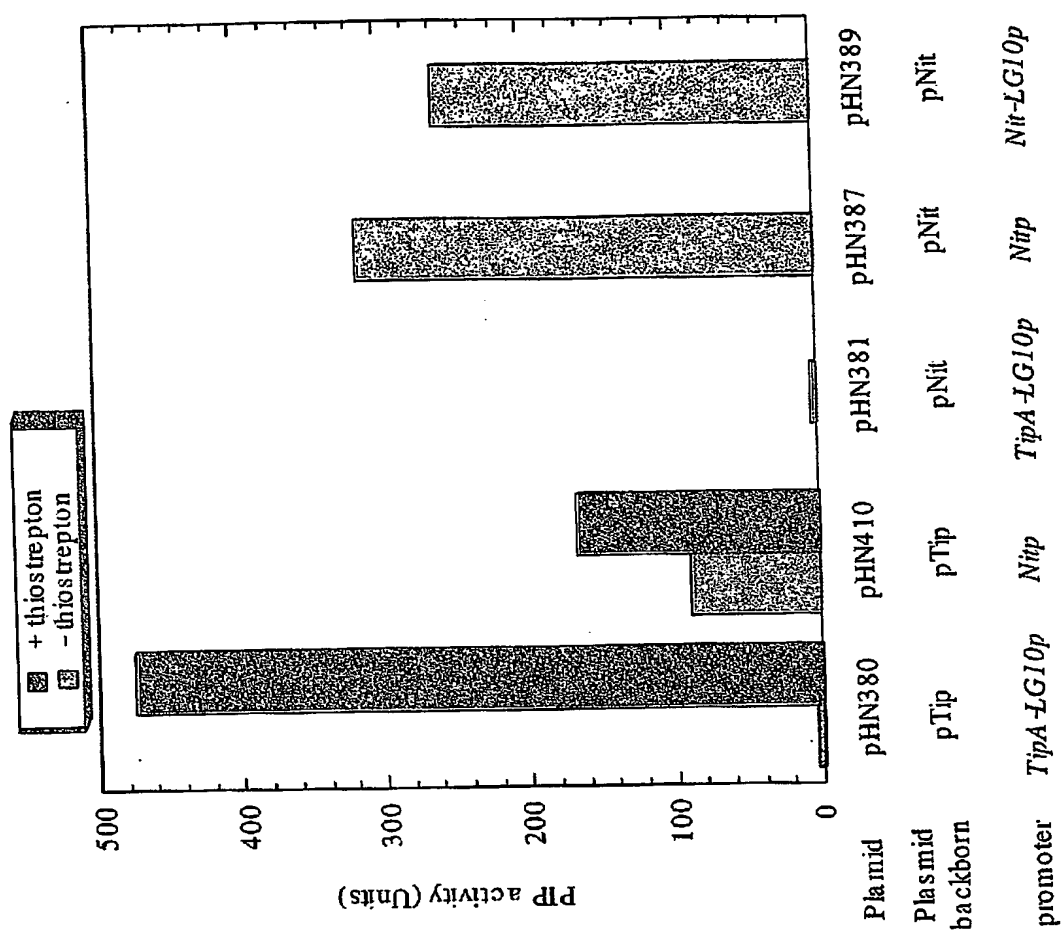
## Type 2

[illegible]

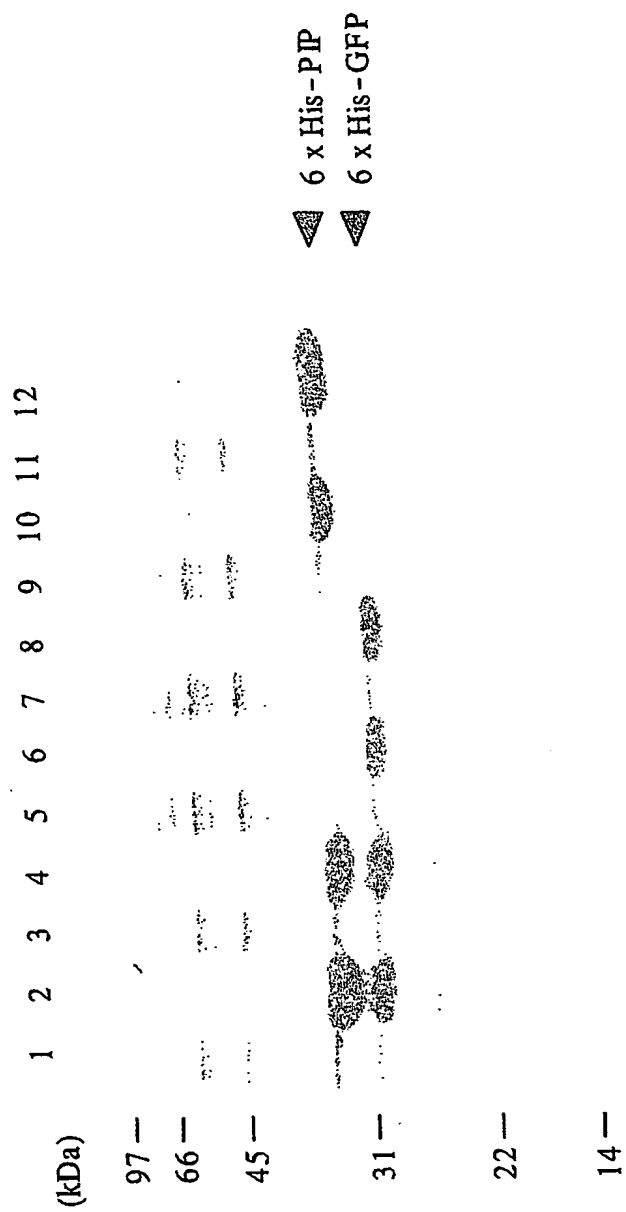
**ALDI**

Spel Sal I  
 ACT AGT CGA CCC ACC GGC ACC ACC GGT GAG CCC CTC GGT GGG GGT CCC GGT GAG AGG GAC TGC AAC ACG CGA AAC CTG CAC AAA UAC AAT CAG GTT  
 CGG ACT CTA GT

【図20】



【図 21】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を構成的に発現し得る発現ベクターの提供。

【解決手段】 TipA遺伝子プロモーターの-10領域配列に変異を導入したプロモーターであって、チオストレプトン非依存的に構成的に下流に存在する遺伝子を発現し得る変異TipA遺伝子プロモーターの有する塩基配列からなるDNAおよび外来遺伝子を構成的に発現するためのプロモーター配列が請求項1から3のいずれか1項に記載のDNAの有する塩基配列であって、その下流にリボソーム結合部位配列、更にその下流に、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位配列を含む、Rhodococcus属細菌用構成型発現ベクター。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 1 6 2 8 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

2 0 0 1 年 4 月 2 日  
新規登録  
東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1  
独立行政法人産業技術総合研究所

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**